

INSELTRANSPLANTATION
IM BB / WISTAR – RATTENMODELL :
UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON
DIABETESSTADIUM UND IMMUNSUPPRESSION AUF
INSELTRANSPLANTATE BEIM AUTOIMMUNDIABETES

HARALD KÖNIGSBERGER

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der
Ludwig-Maximilians Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Brendel

Inseltransplantation im BB/Wistar-Rattenmodell:
Untersuchungen zum Einfluß von Diabetesstadium und Immunsuppression
auf Inseltransplantate beim Autoimmundiabetes

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians Universität
zu München

vorgelegt von
Harald Königsberger

aus
München

Jahr: 1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: 1.) Prof. Dr. Dr. B.U. von Specht
2.) Prof. Dr. H. Frick

Mitberichterstatter: 1.) Prof. Dr. Dr. W. Brendel
2.) Prof. Dr. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.1987

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
2.	Die Eltern	2
3.	Die Kindheit	3
4.	Die Jugend	4
5.	Die Ehe	5
6.	Die Familie	6
7.	Die Erziehung	7
8.	Die Arbeit	8
9.	Die Freizeit	9
10.	Die Krankheit	10
11.	Die Sterblichkeit	11
12.	Die Auferstehung	12
13.	Die Hölle	13
14.	Die Paradiese	14
15.	Die Welt	15
16.	Die Menschheit	16
17.	Die Natur	17
18.	Die Kunst	18
19.	Die Wissenschaft	19
20.	Die Religion	20
21.	Die Philosophie	21
22.	Die Politik	22
23.	Die Wirtschaft	23
24.	Die Gesellschaft	24
25.	Die Kultur	25
26.	Die Literatur	26
27.	Die Musik	27
28.	Die Malerei	28
29.	Die Skulptur	29
30.	Die Architektur	30
31.	Die Gartenkunst	31
32.	Die Landschaftsgestaltung	32
33.	Die Stadtplanung	33
34.	Die Verkehrsplanung	34
35.	Die Umweltschutz	35
36.	Die Energie	36
37.	Die Wasser	37
38.	Die Luft	38
39.	Die Erde	39
40.	Die Sonne	40
41.	Die Sterne	41
42.	Die Galaxien	42
43.	Die Universum	43
44.	Die Zeit	44
45.	Die Raum	45
46.	Die Materie	46
47.	Die Energie	47
48.	Die Information	48
49.	Die Kommunikation	49
50.	Die Medien	50
51.	Die Internet	51
52.	Die Computer	52
53.	Die Software	53
54.	Die Hardware	54
55.	Die Peripherie	55
56.	Die Netzwerke	56
57.	Die Sicherheit	57
58.	Die Ethik	58
59.	Die Moral	59
60.	Die Religion	60
61.	Die Philosophie	61
62.	Die Politik	62
63.	Die Wirtschaft	63
64.	Die Gesellschaft	64
65.	Die Kultur	65
66.	Die Literatur	66
67.	Die Musik	67
68.	Die Malerei	68
69.	Die Skulptur	69
70.	Die Architektur	70
71.	Die Gartenkunst	71
72.	Die Landschaftsgestaltung	72
73.	Die Stadtplanung	73
74.	Die Verkehrsplanung	74
75.	Die Umweltschutz	75
76.	Die Energie	76
77.	Die Wasser	77
78.	Die Luft	78
79.	Die Erde	79
80.	Die Sonne	80
81.	Die Sterne	81
82.	Die Galaxien	82
83.	Die Universum	83
84.	Die Zeit	84
85.	Die Raum	85
86.	Die Materie	86
87.	Die Energie	87
88.	Die Information	88
89.	Die Kommunikation	89
90.	Die Medien	90
91.	Die Internet	91
92.	Die Computer	92
93.	Die Software	93
94.	Die Hardware	94
95.	Die Peripherie	95
96.	Die Netzwerke	96
97.	Die Sicherheit	97
98.	Die Ethik	98
99.	Die Moral	99
100.	Die Religion	100

In Dankbarkeit meinen Eltern

1.	Einleitung	1
2.	Die Eltern	2
3.	Die Kindheit	3
4.	Die Jugend	4
5.	Die Ehe	5
6.	Die Familie	6
7.	Die Erziehung	7
8.	Die Arbeit	8
9.	Die Freizeit	9
10.	Die Krankheit	10
11.	Die Sterblichkeit	11
12.	Die Auferstehung	12
13.	Die Hölle	13
14.	Die Paradiese	14
15.	Die Welt	15
16.	Die Menschheit	16
17.	Die Natur	17
18.	Die Kunst	18
19.	Die Wissenschaft	19
20.	Die Religion	20
21.	Die Philosophie	21
22.	Die Politik	22
23.	Die Wirtschaft	23
24.	Die Gesellschaft	24
25.	Die Kultur	25
26.	Die Literatur	26
27.	Die Musik	27
28.	Die Malerei	28
29.	Die Skulptur	29
30.	Die Architektur	30
31.	Die Gartenkunst	31
32.	Die Landschaftsgestaltung	32
33.	Die Stadtplanung	33
34.	Die Verkehrsplanung	34
35.	Die Umweltschutz	35
36.	Die Energie	36
37.	Die Wasser	37
38.	Die Luft	38
39.	Die Erde	39
40.	Die Sonne	40
41.	Die Sterne	41
42.	Die Galaxien	42
43.	Die Universum	43
44.	Die Zeit	44
45.	Die Raum	45
46.	Die Materie	46
47.	Die Energie	47
48.	Die Information	48
49.	Die Kommunikation	49
50.	Die Medien	50
51.	Die Internet	51
52.	Die Computer	52
53.	Die Software	53
54.	Die Hardware	54
55.	Die Peripherie	55
56.	Die Netzwerke	56
57.	Die Sicherheit	57
58.	Die Ethik	58
59.	Die Moral	59
60.	Die Religion	60
61.	Die Philosophie	61
62.	Die Politik	62
63.	Die Wirtschaft	63
64.	Die Gesellschaft	64
65.	Die Kultur	65
66.	Die Literatur	66
67.	Die Musik	67
68.	Die Malerei	68
69.	Die Skulptur	69
70.	Die Architektur	70
71.	Die Gartenkunst	71
72.	Die Landschaftsgestaltung	72
73.	Die Stadtplanung	73
74.	Die Verkehrsplanung	74
75.	Die Umweltschutz	75
76.	Die Energie	76
77.	Die Wasser	77
78.	Die Luft	78
79.	Die Erde	79
80.	Die Sonne	80
81.	Die Sterne	81
82.	Die Galaxien	82
83.	Die Universum	83
84.	Die Zeit	84
85.	Die Raum	85
86.	Die Materie	86
87.	Die Energie	87
88.	Die Information	88
89.	Die Kommunikation	89
90.	Die Medien	90
91.	Die Internet	91
92.	Die Computer	92
93.	Die Software	93
94.	Die Hardware	94
95.	Die Peripherie	95
96.	Die Netzwerke	96
97.	Die Sicherheit	97
98.	Die Ethik	98
99.	Die Moral	99
100.	Die Religion	100

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	<u>Theoretische Grundlagen</u>	1
1.1.	Der klinische Typ-I-Diabetes	1
1.1.1.	Häufigkeit	1
1.1.2.	Verlauf und Prognose	1
1.1.3.	Ätiologische Faktoren	1
1.1.4.	Faktoren der Autoaggression	4
1.1.4.1.	Zytoplasmatische Inselzellantikörper	4
1.1.4.2.	Inselzellmembranantikörper	4
1.1.4.3.	Unspezifische humorale Faktoren	5
1.1.4.4.	Veränderungen im zellulären Immunsystem	5
1.1.4.5.	Histologische Veränderungen am Zielorgan	5
1.1.4.6.	Zusammenfassung	6
1.2.	Experimentelle Diabetesmodelle	8
1.2.1.	Toxischer Streptozotocin-Diabetes	8
1.2.2.	Immunologischer Streptozotocin-Diabetes	10
1.2.3.	Alloxan-Diabetes	10
1.2.4.	Virusinduzierte Diabetesmodelle	11
1.2.5.	Spontane Diabetesmodelle	11
1.2.6.	Die spontan-diabetische BB/Wistar-Ratte	12
1.2.6.1.	Häufigkeit	12
1.2.6.2.	Verlauf, Klinik und Prognose	12
1.2.6.3.	Ätiologie	13
1.2.6.4.	Faktoren der Autoaggression	13
1.2.6.4.1.	Inselzellmembranantikörper	13
1.2.6.4.2.	Unspezifische Autoantikörper	15
1.2.6.4.3.	Veränderungen im zellulären Immunsystem	15
1.2.6.4.4.	Histologische Veränderungen am Zielorgan	16
1.2.6.4.5.	Histologische Veränderungen anderer Organe	16
1.2.6.5.	Zusammenfassung	17
1.2.6.6.	Vergleichende Übersicht	17
1.2.6.7.	Isogenität im BB/Wistar-Stamm	19

1.3.	Therapieansätze zum Typ-I-Diabetes	20
1.3.1.	Insulintherapie	20
1.3.2.	Immunsuppressive Therapie im "diabetic onset"	20
1.3.3.	Transplantation von B-Zellgewebe	23
1.3.4.	Segmentale Pankreastransplantation	23
1.3.4.1.	Technik der Pankreastransplantation	24
1.3.4.2.	Probleme der Pankreastransplantation	25
1.3.4.3.	Chirurgische Probleme	25
1.3.4.4.	Immunologische Probleme	26
1.3.5.	Inseltransplantation	27
1.3.5.1.	Inselgewinnung aus adultem Pankreas	28
1.3.5.2.	Inselgewinnung aus fötalem oder embryonalem Pankreas	30
1.3.5.3.	Inseltransplantation - Platzierung des Inselgewebes beim Empfänger	31
1.3.5.4.	Verhinderung der Abstoßung - Immunsuppression - Immunalteration - Immunisolation	33
1.3.5.4.1.	Konventionelle Immunsuppressiva	34
1.3.5.4.2.	<u>Anti-Lymphozyten-Globulin (ALG)</u>	34
1.3.5.4.3.	Cyclosporine (CsA)	35
1.3.5.4.4.	Immunalteration	35
1.3.5.4.5.	Immunisolation	36
1.3.5.5.	Bedeutung der autoimmunologischen Vorgänge beim Diabetes für transplantiertes Inselgewebe	37
1.3.6.	Zusammenfassung der Therapiekonzepte	37

2.	<u>Praktischer (experimenteller) Teil</u>	39
2.1.	Problemstellungen	39
2.1.1.	Suffizientes Ein-Spender/Ein-Empfänger-Konzept im BB/Wistar-Modell	39
2.1.2.	Inseltransplantation im Früh- und Spätstadium des Diabetes	40
2.1.3.	Postoperative Immunsuppression mit Cyclosporine	40
2.1.4.	Auswirkungen einer zusätzlichen präoperativen Immunsuppression mit Cyclosporine	41
2.1.5.	Zusammenfassung	41
2.2.	Material und Methoden	41
2.2.1.	Verwendete Rattenstämme	41
2.2.1.1.	Die Lewis-Ratte	42
2.2.1.2.	Die BB/Wistar-Ratte	42
2.2.2.	Chemikalien und Medikamente	43
2.2.3.	Allgemeine Methodik	44
2.2.3.1.	Gewichtsmessung	44
2.2.3.2.	Blutzuckerbestimmung	44
2.2.3.3.	Glukosetoleranz	44
2.2.3.4.	Insulinbestimmung	45
2.2.3.5.	Glukose - und Ketonbestimmung im Urin	45
2.2.3.6.	Narkose und OP-Vorbereitung	45
2.2.3.7.	Statistische Untersuchungen	46

2.2.4.	Spezielle Methodik	46
2.2.4.1.	BB/Wistar-Kolonie München	46
2.2.4.1.i.	Tierhaltung	46
2.2.4.1.2.	Züchtung der BB-Ratte	47
2.2.4.1.3.	Screening und Einstellung des Diabetes	48
2.2.4.1.4.	Populationsdaten	49
2.2.4.1.5.	Probleme bei der Haltung der BB/Wistar-Ratte	50
2.2.4.2.	Inselisolation	51
2.2.4.3.	In-vitro-Glukosestimulation	56
2.2.4.4.	Inseltransplantation	57
2.2.4.4.1.	Technik der Inseltransplantation	57
2.2.4.4.2.	Postoperativer Verlauf - Abstoßung	59
2.2.4.4.3.	Transplantationsgruppen - "pseudo"-Isogenität	59
2.2.4.5.	Immunsuppression	62
2.2.4.5.1.	Dosierung, Aufbereitung und Applikation	62
2.2.4.5.2.	Cyclosporine - Spiegel	62
2.2.4.6.	Histologische Untersuchungen	63

3.	<u>Ergebnisteil</u>	64
3.1.	Inselisolation	64
3.1.1.	In-vitro-Glukosestimulation	66
3.2.	Funktionelle Untersuchungen zum Diabetes beim Empfänger vor Transplantation	67
3.3.	Inseltransplantationsergebnisse (allgemein)	67
3.3.1.	Funktionelle Untersuchungen nach Transplantation	70
3.4.	Inseltransplantation ohne Immunsuppression	71
3.4.1.	"Pseudo"-isogene Transplantationsgruppen	72
3.4.2.	Allogene Transplantationsgruppen	73
3.5.	Inseltransplantation mit postoperativer Cyclosporine-Therapie	76
3.5.1.	"Pseudo"-isogene Transplantationsgruppen	76
3.5.2.	Allogene Transplantationsgruppen	78
3.6.	Inseltransplantation mit prä- <u>und</u> postoperativer Cyclosporine-Therapie	80
3.6.1.	"Pseudo"-isogene Transplantationsgruppen	81
3.6.2.	Allogene Transplantationsgruppen	83
3.7.	Cyclosporine-Spiegel	85
3.8.	Histologische Untersuchungen	86
3.8.1.	Histologische Dokumentation des Diabetes der BB/Wistar-Ratte	86
3.8.2.	Histologische Untersuchungen an inseltransplantierten Empfängern	94
3.9.	Zusammenfassung der Ergebnisse	102

4.	<u>Diskussionsteil</u>	106
4.1.	Diskussion der Methodik	106
4.2.	Diskussion der Ergebnisse	109
5.	<u>Zusammenfassung</u>	116
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	
7.	Verzeichnis histologischer Abbildungen	
8.	Dankvermerk	
9.	Lebenslauf	

1. Theoretische Grundlagen

1.1. Der klinische Typ-I-Diabetes

1.1.1. Häufigkeit

Der juvenile insulinabhängige oder Typ-I-Diabetes mellitus tritt in den USA mit einer jährlichen Inzidenz von 15 in 100000 auf (44,141). Betroffen sind vorwiegend Menschen im Alter zwischen 15 und 24 Jahren, jedoch sind auch Ersterkrankungen jenseits des 40. Lebensjahres beobachtet worden. Bei den bis 20jährigen beträgt die Prävalenz der Erkrankung 1 von 300 Individuen (44,57,141).

1.1.2. Verlauf und Prognose

Der Beginn der Erkrankung ist meist durch sehr wechselhaften Verlauf mit unspezifischen Symptomen gekennzeichnet. Dies erschwert die Diagnose, und so sind die Patienten meist schon insulinpflichtig, wenn die Krankheit entdeckt wird. Verlauf und Prognose sind trotz der Fortschritte bei der Insulintherapie (z.B. die Insulinpumpenbehandlung) ungünstig. Spätkomplikationen wie diabetische Retinopathie, Nephropathie, Mikro- wie Makroangiopathie treten bereits nach durchschnittlich 15 Jahren auf (50,57).

1.1.3. Ätiologische Faktoren

Trotz vieler gewonnener Teilerkenntnisse ist es bisher noch nicht gelungen, die Ätiologie endgültig zu klären. Unter Berücksichtigung des momentanen Wissenstandes, sei im folgenden eine mögliche Hypothese der Diabetesentstehung erläutert (vgl. Abbildung 1).

ENTSTEHUNG:

JUVENILER DIABETES MELLITUS (TYP 1)

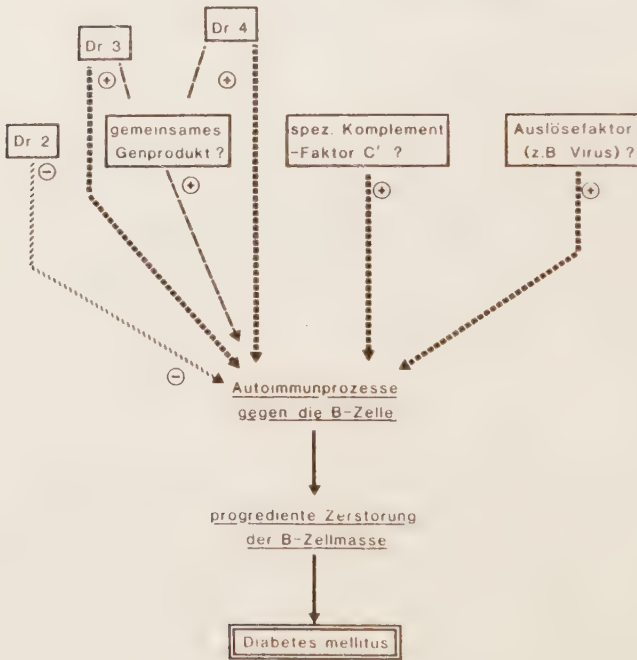


Abb. 1

Familiäre Häufung und eine Konkordanz von bis zu 50% bei eineiigen Zwillingen lenken den Verdacht auf eine mögliche genetische Disposition beim Typ-1-Diabetes. Bei über 95 % der juvenilen Diabetiker findet sich HLA Dr 3 und/oder Dr 4 (1,32,57,114). Da andere Autoimmunerkrankungen wie der systemische Lupus erythematodes, Morbus Basedow

oder Myasthenia gravis bei Trägern von HLA Dr 3 gehäuft vorkommen, ist zu vermuten, daß mit diesem Antigen eine Disposition für Autoimmunerkrankungen vererbt wird. HLA Dr 4 dagegen wird mit einer virusinduzierten B-Zell-Zytotoxizität in Zusammenhang gebracht. Einen relativ protektiven Effekt schreibt man hingegen HLA Dr 2 zu, denn Träger dieses Antigens erkranken signifikant weniger (32,33,57,62,114). Trotzdem ist ein Diabetes mit HLA Dr 2 oder anderen seltenen Kombinationen möglich (32,57). Man stellt sich deshalb vor, daß die suspekten HLA-Antigene nur als Marker sogenannten Empfänglichkeitsantigenen assoziiert sind, die auf dem entsprechenden Chromosom in ihrer Nähe liegen (18). Diese, so vermutet man, können über ein gemeinsames Genprodukt oder für sich selbst wirken. Weiterhin wird auch noch die Beteiligung eines genetisch determinierten Komplementfaktors diskutiert (1).

Als zweite notwendige Komponente stellt man sich ein "triggering" durch einen Umweltfaktor vor. Zwillingsuntersuchungen ergaben, daß die Mehrzahl der eineiigen Zwillingspaare nicht konkordant bezüglich der Entwicklung eines Typ-I-Diabetes sind. Außerdem können bis zu 36 Jahre vergehen, ehe sich die Krankheit beim zweiten Geschwister manifestiert (32). Als auslösender Umweltfaktor kommt in erster Linie eine Virusinfektion in Betracht. Mehrere Autoren (3,57,160) berichten über das Auftreten eines Typ-I-Diabetes nach Infektion mit Mumps, Coxsackie B 4 und anderen Viren. Als weiterer Faktor steht auch die alimentäre Proteinzufuhr zur Diskussion. Ethnologische Untersuchungen bei Sudseeinsulanern liefern Hinweise für diese These (35).

So stellen die genetische Konstellation als Vorbedingung und der Umwelteinfluß als "triggering event" den Ausgangspunkt für Autoimmunprozesse dar, die letztlich zur Zerstörung der B-Zellmasse führen (siehe Abbildung 1).

1.1.4. Faktoren der Autoaggression

Beim Menschen finden sich in erster Linie humorale Veränderungen als Zeichen einer Autoaggression.

1.1.4.1. Zytoplasmatische Inselzellantikörper (engl.: islet cell antibodies = ICA)

Diese Antikörper sind B-Zell-spezifisch und gegen zytoplasmatische Anteile gerichtet. Es besteht hohe Krankheitsspezifität. Im "diabetic onset" weisen 87% aller Diabetiker diese Antikörper auf. Nach einem Jahr sind es nur noch 23%. Die Mehrzahl der Patienten zeigt diesen abfallenden Verlauf. Es wurde auch beobachtet, daß ICA dem Diabetes vorausgehen können, besonders bei im Gefolge von Virusinfekten auftretendem IDDM (= insulin dependent diabetes mellitus = Typ-1-Diabetes) (3,32,56,57,59,84).

1.1.4.2. Inselzellmembranantikörper (engl.: islet cell surface antibodies = Inselzellmembranoberflächenantikörper = ICSA)

Wie der Name besagt, sind diese Antikörper gegen die Membran von Inselzellen gerichtet. Ihr Vorkommen beträgt 30-60 % bei Typ-1-Diabetikern. Sie treten aber auch beim Typ-11-Diabetes und nach bakteriellen und viralen Infekten auf. Bei 1/4 der erstgradig Verwandten von juvenilen Diabetikern lassen sich ebenfalls diese Antikörper nachweisen. Der Verlauf entspricht den zytoplasmatischen Antikörpern (3,32,57).

1.1.4.3. Unspezifische humorale Faktoren

Antinukleäre Antikörper (ANA) und zirkulierende Immunkomplexe (CIC), die auch bei anderen Autoimmunkrankheiten auftreten, zeigen häufig einen parallelen Verlauf mit den Inselantikörpern. Ihr Niveau liegt jedoch in der Regel weit unter dem der spezifischen Faktoren.

Bei 16% der Patienten finden sich parallel zu den Inselantikörpern auch Antikörper gegen andere endokrine Gewebe, wie Schilddrüse, Nebennierenrinde, Hypophysenvorderlappenzellen oder Zellen der Magenschleimhaut. Ähnliches kann in bis zu 30% bei Grad I-Verwandten von Diabetikern auftreten (57).

1.1.4.4. Veränderungen im zellulären Immunsystem

Über Veränderungen der Lymphozyten, deren Subpopulationen und spezifische Eigenschaften gibt es derzeit nur wenige, teils sehr widersprüchliche Beobachtungen. Als Zeichen einer Aktivierung des T-lymphozytären Systems fand sich bisher bei einigen Patienten eine Erhöhung Ia-Antigen-tragender Zellen und der T-Killerzellen, sowie eine gleichzeitige Verminderung von T-Suppressorzellen (7,22,24,57). Auch konnte eine zytotoxische Reaktion von Diabetikerlymphozyten gegen kultivierte menschliche Insulinomzellen und eine in-vitro-Verminderung der Insulinfreisetzung von isolierten Inseln nach Zugabe von Lymphozyten eines Diabetikers gezeigt werden (14).

1.1.4.5. Histologische Veränderungen am Zielorgan

Als histo-morphologisches Substrat von Autoaggressionsprozessen an der Langerhans'schen Insel im Pankreas sind lymphomonozytare Infiltrationen peri- und intrainsulär beschrieben worden. Bei langer andauerndem

manifesten Diabetes findet sich als Endzustand dieser B-Zell-schädigenden Reaktionen eine B-Zell-arme oder-freie, deutlich verkleinerte Langerhans'sche Insel. Auf Grund der erschwerten Gewinnung von Biopsiematerial beschränken sich die bisher gewonnenen Erkenntnisse weitgehend auf zufällig entdeckte Einzelbefunde nach Sektionen oder Operationen (65).

1.1.4.6. Zusammenfassung

Nach Eisenbarth (32) kann man sich die Diabetesentstehung folgendermaßen vorstellen (vgl. Abbildung 2):

- Stadium 1: Genetische Disposition mit den HLA-Antigenen Dr 3 und Dr 4 als Risikofaktoren
- Stadium 2: Umweltfaktor als auslösendes Ereignis, z.B. Virus
- Stadium 3: Aktive Autoimmunprozesse mit beginnender B-Zellzerstörung
- Stadium 4: Fortgeschrittene B-Zellinsuffizienz, Blutglukosespiegel noch normal, Glukosetoleranz und Insulinfreisetzung bereits auffällig
- Stadium 5: Apparente Manifestation des Diabetes, nur noch geringe Insulin- und C-Peptidspiegel meßbar
- Stadium 6: Endstadium, gesamte B-Zellmasse zerstört, kein endogenes Insulin oder C-Peptid meßbar, typische Komplikationen im weiteren Verlauf

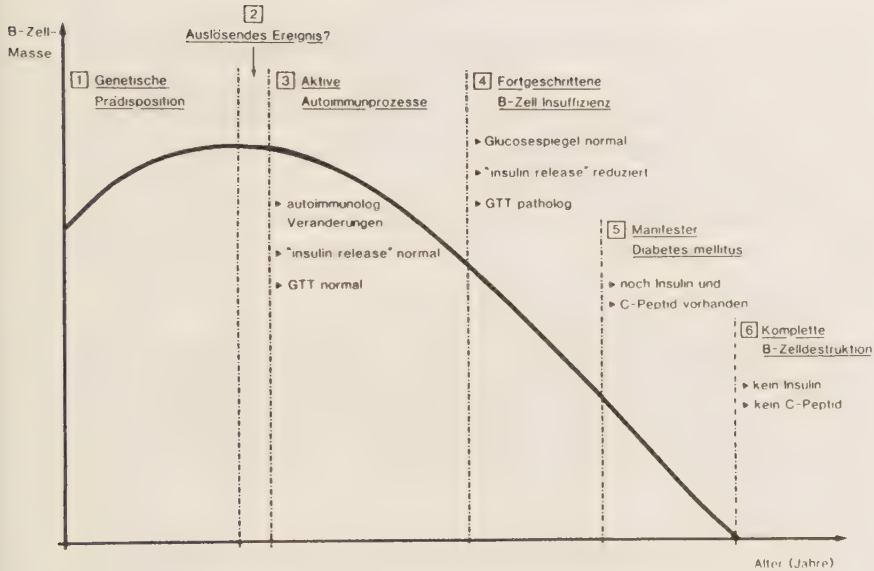


Abb. 2

Im Hinblick auf eine präventive Immuntherapie, auf die später noch eingegangen werden soll, wäre es nötig, die Diagnose bereits im Stadium 3 bis 4 zu stellen, um noch eine ausreichende B-Zellmasse zu konservieren. Wie experimentelle Befunde ergaben, ist erst bei Unterschreiten von 15 % der Ausgangs-B-Zellmasse mit der Manifestation des Diabetes zu rechnen (32). So fällt der Zeitpunkt der Diagnose bisher noch überwiegend in die Stadien 5 bis 6, wo eine konservative Therapie eigentlich zu spät kommt (32,57).

1.2. Experimentelle Diabetesmodelle

Bis heute wurden viele verschiedene experimentelle Diabetesmodelle gefunden, die dem Typ-1-Diabetes beim Menschen teils mehr, teils weniger entsprechen. Leider beschränken sich die meisten auf Nagetiere, die versuchs- und labortechnisch zwar leicht zu handhaben sind, sich morphologisch und funktionell jedoch in einigen wichtigen Punkten vom Menschen unterscheiden. Beim Großtier gibt es bisher außerhalb der reinen Pankreatektomie keine verwendbaren experimentellen Diabetesformen.

Im folgenden seien hier nur die am häufigsten verwandten und klinisch relevantesten Diabetesmodelle kurz umrissen. Man kann sie in toxische (z.B. Streptozotocin, Alloxan), immunologische (z.B. BB/Wistar-Ratte, Low-dose-Streptozotocin) und spontane Modelle (New Zealand, Obese Mouse, Viren etc.) einteilen (siehe Abbildung 3).

1.2.1. Toxischer Streptozotocindiabetes ("high dose-Modell")

Streptozotocin (2-desoxy-2-(3-methyl-3-nitrosurea)-D-glucopyranose) führt nach bisherigem Kenntnisstand zu einer selektiv-toxischen Schädigung der B-Zellen, über eine direkte Anlagerung an die Zellmembran. Histologisch beobachtet man in der Folge eine selektive B-Zell-Nekrose. Die Langerhans'schen Inseln erscheinen verkleinert. Eine Insulitis, gekennzeichnet durch die Einwanderung von leukozytären Zellen, ist nicht erkennbar (103).

Klinisch findet sich beim Nager ein Anstieg der Blutglukose mit Polyurie, Polydipsie und Polyphagie 2 bis 3 Wochen nach Injektion von Streptozotocin. Bei progredientem starken Gewichtsverlust sterben die Tiere unbehandelt nach 2 bis 3 Monaten.

EXPERIMENTELLE DIABETESMODELLE:

- | | |
|--|--|
| a) <u>BB/Wistar-Ratte</u> | ▶ Autoaggression |
| b) <u>Streptozotocin</u> | ▶ "low dose" → Insulitis, aber kein stabiler Diabetes
▶ "high dose" → B-Zell-toxisch |
| c) <u>Alloxan</u> | ▶ B-Zell-toxisch |
| d) <u>Virusmodelle</u> | ▶ Coxsackie, Röteln, Mumps, Maul- u Klauen-Seuche
→ entzündl bzw. B-Zell-toxische Veränderungen |
| e) <u>"obese mouse"-und
"obese hamster"-
Modelle, u.a.</u> | ▶ oft kein stabiler Diabetes,
▶ Hyperinsulinismus,
▶ ähnelt mehr dem Typ 2 |

Nachteile:

- | | |
|-------------|---|
| b) c) d) e) | ● fehlende autoimmunologische Komponente
● Metabolismus in manchen Modellen sehr vom humanen Diabetes abweichend
● Gefahr der Spontanremission hoch |
| a) | ● keine strenge Inzucht möglich
● Insulinflicht |

Abb. 3

Die beste Wirkung läßt sich bei intravenöser oder intraperitonealer Applikation erzielen. Über die geeignete Dosis finden sich unterschiedliche Angaben von den einzelnen Autoren (29.115), das Optimum für die Diabetesinzidenz, bei geringer Letalität, liegt im Rattenmodell zwischen 50 und 65 mg/kg Körpergewicht. Spontanremissionen sind in diesem Dosisbereich wenig wahrscheinlich.

Neben den Nagermodellen (Maus, Ratte) ist durch Streptozotocin in anderen Tiermodellen kein zuverlässiger experimenteller Diabetes induzierbar. Die frühere Anwendung zur medikamentösen Behandlung beim Insulinom ist wegen möglicher karzinogener und schlechter therapeutischer Wirkung beim Menschen wieder verlassen worden.

1.2.2. Immunologischer Streptozotocin-Diabetes ("Low-Dose-Modell")

Eine Variante des toxischen Streptozotocin-Diabetes in hoher Dosierung ist die Entwicklung einer "Insulitis" nach mehrmaliger Injektion von unterschwelligen Dosen von Streptozotocin. Die so nur bei bestimmten Mausestammen auslösbare "Insulitis" kann aber auch in der Folge überprogre-diente B-Zellerstörung zum Diabetes führen (90,127).

Wie sich durch eine Beteiligung von T-Lymphozyten zeigen ließ, spricht vieles für eine zwar nicht autoimmunologische, doch zumindest immunologisch vermittelte, spezifische Reaktion gegen B-Zellen. Man vermutet, daß es über eine Veränderung der Inselzelloberfläche durch Streptozotocin zur Induktion einer immunologischen Reaktion und in der Folge zur Einwanderung von lymphatischen Zellen im Bereich der Insel kommt. Durch Immunsuppression läßt sich dieser Vorgang unterdrücken (82,103, 107). Nach unterschwelliger Gabe von Streptozotocin läßt sich auch in manchen Mausestammen die Induktion eines spezifischen Virus beobachten (103).

1.2.3. Alloxandabetes

Alloxan (2, 4, 5, 6 - tetraoxy - hexahydropyrimidine) wirkt ebenfalls toxisch, der genaue Mechanismus ist jedoch unbekannt. Seine Wirkung kann durch Glukose und andere Saccharide verringert werden. Fasten und Hyperglykämie jedoch potenzieren den diabetogenen Effekt (103).

Histologisch findet sich ebenfalls eine Verminderung der B-Zellen bei fehlender Insulitis. Die klinischen Veränderungen gleichen weitgehend dem Streptozotocin-high-dose-Modell (90,103,127). Alloxan ist außer bei den Nagern auch bei anderen Spezies wirksam (z.B. Hund).

1.2.4. Virusinduzierte Diabetesmodelle

Bei einer Vielzahl von Viren kann in verschiedenen Spezies nach Infektion das Ausbrechen eines Diabetes beobachtet werden. Die an der Insel ablaufenden Veränderungen sind wenig einheitlich und die Pathogenese in den meisten Fällen unklar. Interessanterweise sind alle Viren, nach deren Infektion beim Menschen gehäuft Diabetes auftritt, auch im Tiermodell pathogen. So z.B. Cocksackie B 4-Virus bei der Maus, Mumpsvirus beim Affen und Rötelvirus beim Kaninchen (57,103).

1.2.5. Spontane Diabetesmodelle

Neben der BB/Wistar-Ratte, die noch genauer vorgestellt wird, finden sich spontane Hyperglykämie noch in einigen anderen Nagerstammen. Bei den meisten dieser Tiere entsteht der Diabetes im Zusammenhang mit einer bestimmten genetischen Kombination bei gleichzeitig extremem Übergewicht. Oft ist der Diabetes nicht stabil und gleicht mehr dem Typ II als dem IDDM. (103). Für Transplantationsversuche sind die meisten davon nicht geeignet.

Als einziges Primatenmodell fand sich bisher *Macaca nigra* mit einem nur milden Diabetes und amyloidartigen Infiltrationen im Pankreas (103).

1.2.6. Die spontan-diabetische BB/Wistar-Ratte

Dieses Syndrom wurde 1974 in den Bio Breeding Laboratories der Sir Frederik Banting Society in Ottawa, Ontario entdeckt und leitet sich vom Wistar Furth Stamm (RT 1u) ab (53).

1.2.6.1. Häufigkeit

Diabetes manifestiert sich in diesem Stadium zwischen dem 60. und 140. Tag eines Rattenlebens (vom Alter vergleichbar dem Jugendalter beim Menschen). Von Beginn an besteht Insulinpflicht. Die Inzidenz schwankt je nach Erbanlage der Vorfahren zwischen 40 und 60 % (110,111).

1.2.6.2. Verlauf, Klinik und Prognose

Aus einem pradiabetischen Stadium mit pathologischer Glukosetoleranz entwickelt sich entweder eine fulminante Verlaufsform mit schneller, oder eine mildere Form mit langsamer ansteigendem Insulinbedarf. Als dritte Möglichkeit verbleiben die Tiere im pradiabetischen Stadium.

Als klinische Symptome des Diabetes treten auf: Polyphagie, Polyurie und Polydipsie (>100 ml/Tag-normale Trinkmenge einer Ratte=10 ml/Tag), Glukosurie (>10 g/Tag), Hyperglykämie im Bereich zwischen 20-30 mmol/l (360-560 mg/dl) (88,98,110,111).

Zur Spätprognose dieses Syndroms gibt es nur wenige Untersuchungen. Deshalb kann noch keine Aussage getroffen werden, ob es Spätkomplikationen gibt, die den beim Menschen gefundenen ähnlich sind. Es fand sich bisher lediglich ein Anhalt für eine möglicherweise auftretende Neuropathie (98).

1.2.6.3. Ätiologie

Nach dem momentanen Kenntnisstand fordert man die ursachliche Beteiligung zweier Gene bei der Diabetesentstehung der BB/Wistar-Ratte. Zum einen, ein sogenanntes "Lymphopenie-Gen", welches autosomal-rezessiv vererbt wird und eine 100%ige Penetranz aufweist. Vererbt wird eine vorwiegende T-Zell-Lymphopenie (88,98,109-111). Zum anderen fordert man ein Gen, welches dem RT 1 Locus der Ratte, der beim Menschen dem HLA-System entspricht, assoziiert ist. Man fand, daß alle Ratten, bei denen sich ein Diabetes manifestiert, homozygot für Chromosom 11a sind, welche zum determinierenden Komplex des RT 1 Locus gehört (32). Auf diesem Chromosom scheint das Diabetesgen dem Komplex I-A-Alpha assoziiert (23).

Beide genannten Gene zusammen sind notwendig zur Entstehung des Diabetes. Im Gegensatz zum humanen IDDM finden sich bei der Ratte noch kaum Hinweise für den gleichzeitigen Einfluß eines Umweltfaktors. Um Autoimmunprozesse in Gang zu bringen, welche die progrediente Zerstörung der B-Zellmasse bewirken, sind im Rattenmodell anscheinend nur die beiden konditionierenden Gene nötig (vgl. Abbildung 4).

1.2.6.4. Faktoren der Autoaggression

Die BB/Wistar-Ratte bietet vielfältige Veränderungen im Immunsystem, als Spiegel der autoimmunologischen Vorgänge.

1.2.6.4.1. Inselzellmembranantikörper (= islet cell surface antibodies = ICSA)

Diese gegen die Zellmembran von Inselzellen, nicht nur alleine B-Zellen (31), gerichteten Antikörper, können dem Diabetes bis zu 6

Wochen vorausgehen. Ihr Maximum liegt um den Zeitpunkt der klinischen Manifestation ("diabetic onset"); im weiteren Verlauf nehmen sie bis zum 25. Tag "post onset" wieder ab. Sie können aber auch auf unterschiedlichem Niveau längere Zeit persistieren (30,31,57,98,119). ICsA sind präsent bei nahezu allen diabetischen Tieren, können aber auch bei Individuen auftreten, die später nicht erkranken (31).

ENTSTEHUNG:

SPONTANER DIABETES MELLITUS DER BB WISTAR RATTE

T-Lymphopenie-Gen
autosomal rezessiv
Penetranz. 100%

RT 1 Locus
(Δ HLA beim Menschen)
homozygot für Gen II a

↓
Autoimmunprozesse

? zytotoxische Zellen gegen Inselgewebe

oder

? Autoaggression durch gestörte T-Regulation
auf Grund einer fehlenden T-Untergruppe

oder

? humorale Antikörper IAB, CIC, ANA
als Mediatoren der Destruktion

oder

? gestörte Immunregulation durch Milz -
lymphozyten Antikörper



progrediente Störung der β -Zellmasse



Diabetes mellitus

Abb. 4

1.2.6.4.2. Unspezifische Autoantikörper

Parallel zum Auftreten von ICSSA beobachtet man bei der BB/Wistar-Ratte die Entwicklung von Autoantikörpern gegen endokrine Gewebe (Schilddrüse, Zellen der Magenschleimhaut), gegen glatte Muskulatur und gegen Ratten-Milz-Lymphozyten. Diese Faktoren treten in unterschiedlicher Häufigkeit auf. Dyrberg (31) beobachtete Milz-Lymphozyten-Antikörper (MLA) in allen Tieren, die später einen Diabetes entwickelten. In einer Gruppe mit hohem Risiko für Diabetes waren die MLA-Titer bereits von Geburt an erhöht. Es scheint, als stehe das Auftreten dieser Antikörper im ursächlichen Zusammenhang mit der Entstehung des Diabetes (30,31,87,119).

1.2.6.4.3. Veränderungen im zellulären Immunsystem

Hier steht die ausgeprägte T-Lymphopenie im Vordergrund. Die Gesamtheit aller T-Zellen, T-Helfer und T-Suppressorzellen, ist stark erniedrigt (52,61,120). Die B-Lymphozyten sind in ihrer Gesamtzahl ebenfalls etwas vermindert. Als Ursache hierfür vermutet man einen Defekt bei der Reifung der T-Lymphozyten im Thymus. Welche Rolle die MLA spielen, ob sie die Lymphopenie bewirken, ist bisher nicht geklärt (32,98,110).

Eine Reduktion der Diabetesinzidenz durch neonatale Thymektomie (89) und das völlige Ausbleiben nach Knochenmarkstransplantation (109) bestätigen die Hypothese der Notwendigkeit einer Störung im zellulären Immunsystem für die Entstehung des spontanen Diabetes. Dies wird noch bestärkt durch den Befund, daß sich durch Transfer von Lymphozyten "frisch" diabetischer Ratten eine "Insulitis" in der nackten (athymischen) Maus induzieren läßt (112).

1.2.6.4.4. Histologische Veränderungen am Zielorgan

Die charakteristische morphologische Veränderung an der Langerhans'schen Insel wird als "Insulitis" bezeichnet. Wie beim Menschen findet sich in diesem Diabetesmodell eine Infiltration von Lymphozyten und Monozyten peri- wie intrainsular (32,88,98,111). B-Zellen werden von den Lymphozyten umgeben und somit von den anderen Inselzellen formlich isoliert (110). Während man um den Zeitpunkt des "diabetic onset" ein Maximum der Infiltration erkennt, wird mit zunehmenden Bestehen des Diabetes ein Abnehmen der Inselanzahl, Inselgröße und der "Insulitis" erkennbar. B-Zellen können kaum oder nicht mehr nachgewiesen werden. Es bleiben "ausgebrannte", kleine Inseln, die nur noch A-, D- und PP-Zellen enthalten (vgl.: 3.8.1. und 88,98,110,111). Im Endstadium der B-Zellzerstörung bei zunehmendem exogenen Insulinbedarf verschwindet dann die "Insulitis" wieder gänzlich.

1.2.6.4.5. Histologische Veränderungen anderer Organe

Hier steht im Vordergrund die lymphozytare Thyroiditis, die in bis zu 60 % bei diabetischen BB/Wistar-Ratten beobachtet wird (140). Es handelt sich wiederum um ein lympho-monozytaires Infiltrat in der Schilddrüse. Nach bisherigen Untersuchungen kommt es jedoch zu keiner Veränderung der Schilddrüsenfunktionsparameter (140). Des weiteren fanden sich auch noch Veränderungen an der Magenschleimhaut sowie bei einigen Tieren eine auftretende Orbitopathie, beide wurden bisher noch nicht näher charakterisiert (95).

1.2.6.5. Zusammenfassung

Ausgehend von der genetischen Konstellation der BB/Wistar-Ratten, d.h. der beiden zur Diabetesentstehung notwendigen Gene, stellt man sich die Mechanismen der Autoaggression wie folgt vor (vgl. Abbildung 4):

- es könnten direkt gegen B-Zellen zytotoxisch wirkende Lymphozyten gebildet werden
- durch eine Regulationsstörung der T-Lymphozyten, ausgelöst durch Fehlen einer T-Untergruppe, wird eine Autoaggression möglich gemacht
- humorale Faktoren könnten als Mediatoren der Autoaggression auftreten
- eine gestörte Immunregulation könnte zusätzlich durch die mitauf-tretenden Milz-Lymphozyten-Antikörper verursacht werden.

Soweit die weitgehend hypothetischen Vorstellungen zur Diabetesentstehung der BB/Wistar-Ratte.

1.2.6.6. Vergleichende Übersicht

Beim Vergleich der vorgestellten Diabetesmodelle ist offensichtlich, daß die spontan-diabetische BB/Wistar-Ratte dem IDDM beim Menschen von allen derzeit bekannten experimentellen Modellen am besten entspricht. Den toxischen Modellen fehlt die autoimmunologische Komponente. Virale und andere spontane Modelle zeigen teilweise sehr erhebliche morphologische und funktionelle Unterschiede, wie z.B. im Mechanismus, der zum Diabetes führt und bei den auftretenden klinischen Symptomen.

VERGLEICH:

SPONTANER DIABETES — JUVENILER DIABETES (TYP 1)

BB/WISTAR RATTE

MENSCH

GEMEINSAMKEITEN:

- Erkrankungen im jugendlichen Alter
- oft von Beginn an hohe Dosen Insulin
- grosse Neigung zu Ketoacidose
- genetische Komponente vorhanden
- Autoantikörper gegen Inselbestandteile vorhanden
- histopathologische Veränderungen am Pankreas

UNTERSCHIEDE:

Ratte

Mensch

- bisher nur Neuropathie als Spätkomplikation
- überwiegend zelluläres Immunsystem verändert

- ausgeprägtes diabetisches Spätsyndrom
- überwiegend humorale Faktoren verändert
- Umweltfaktor wahrscheinlich

Die wichtigsten Gemeinsamkeiten zwischen Mensch und BB/Wistar-Ratte (vgl. Abbildung 5):

- Diabetes tritt vorwiegend im Jugendalter auf.
- Von Beginn an besteht meist hoher Insulinbedarf.
- Es zeigt sich große Neigung zur Ketoazidose.
- Eine genetische Komponente ist ätiologisch beteiligt.
- Antikörper gegen Inselbestandteile treten als Ausdruck eines Autoaggressionsgeschehens auf.
- Histopathologische Veränderungen an der Insel sind gleichartig.

Als Unterschiede ergeben sich:

- An Spätkomplikationen wird im Rattenmodell bisher nur über die Neuropathie berichtet (98), im Vergleich zum komplexen diabetischen Spätsyndrom beim Menschen. Allerdings stehen hierzu noch detaillierte Untersuchungen aus.
- Bei Veränderungen im Immunsystem dominiert der zelluläre Bereich im Rattenmodell. Wenngleich sich beim Menschen auch hier Veränderungen andeuten, so zeigen sich bisher hauptsächlich Autoantikörper als Ausdruck autoimmunologischer Vorgänge.
- Hinweise für ein "triggering" durch Umweltfaktoren, beim Menschen wahrscheinlich, bestehen nicht für die BB/Wistar-Ratte.

1.2.6.7. Isogenität im BB/Wistar-Stamm

Auf einen Nachteil des BB/Wistar-Modells muß jedoch noch eingegangen werden, weil dadurch die Beurteilung immunologischer Prozesse bei Transplantationsversuchen erschwert wird. Die Tatsache, daß die ursprüngliche BB/Wistar-Kolonie nicht genetisch homogen war und auch

zur Weiterzucht keine strenge Inzucht praktiziert wurde, erlaubt nicht die Bezeichnung isogen bei Transplantationen innerhalb der Kolonie. Es bleibt also eine geringfügige allogene Komponente vermutlich erhalten. Wie Untersuchungen von Naji (108,109,121) zeigten, verhalten sich momentan, nachdem für einige Jahre doch konsequente Inzucht betrieben wurde, BB-Ratten immunologisch isogen. Hauttransplantate, die länger als 100 Tage überleben, und immunologische Tests (z.B. Mixed Lymphocyte Culture = MLC) belegen dies.

Deshalb sollen Transplantationen innerhalb der Münchner BB-Kolonie als "~~pseudo~~"-isogen bezeichnet werden, um dem o.g. Rechnung zu tragen.

1.3. Therapieansätze zum Typ I-Diabetes

1.3.1. Insulintherapie

Die Insulintherapie, die als symptomatische Anfangs- und Standardtherapie, bei allen Typ I-Diabetikern noch immer am häufigsten zur Anwendung kommt, soll hier nicht näher ausgeführt werden. Trotz erheblicher Verbesserung bei der Diabeteseinstellung (z.B. Insulinpumpenbehandlung) ist es langfristig noch nicht gelungen, Spatkomplikationen erheblich einzudämmen oder zu verhindern (44).

1.3.2. Immunsuppressive Therapie im "diabetic onset"

Dieser atiologisch orientierte Therapieansatz, der von einer Konservierung von Rest-B-Zellgewebe durch Suppression der autoimmunologischen Zerstörung im Manifestationsstadium des Diabetes ausgeht, ist in den

letzten Jahren mehrfach auf verschiedenen Wegen versucht worden. Den momentanen Höhepunkt bildet eine weltweite klinische Studie mit Cyclosporine (CsA)-Therapie im "diabetic onset". Anlaß hierfür waren die hoffnungsvollen, experimentellen Befunde bei der BB/Wistar-Ratte. Hier gelang es Laupacis, Thibert und anderen (80,86) die Diabetesinzidenz in einer "high-risk"-Gruppe von Ratten auf nahe 0% zu vermindern (vgl. Abb. 6).

THERAPIEANSÄTZE

	JUVENILER DIABETES (TYP 1)	SPONTANER DIABETES DER BB/WISTAR RATTE
CYCLOSPORIN	Remission in 50% einer Gruppe Typ 1 Diabetiker (Stiller e.a.)	Reduktion der Diabetesinzidenz in einer "high risk"-Gruppe von 75% auf 0% Thibert e.a 1983
ALG		bei Gabe im "onset" Remission von 36% Like e.a 1982
KONVENTIONELLE IMMUNSUPPRESSION: Azathioprin, Prednison	wenig Effekt	erhöht Remissionsrate in Verbindung mit CsA Rossini e.a 1983
NEONATALE THYMECTOMIE		Inzidenz von 27% auf 3% reduziert Eisenbarth 1984
LYMPHKNOTEN- BESTRAHLUNG		vermindert Inzidenz um 24% Eisenbarth 1984
BLUTTRANSFUSIONEN		vermindern Diabetes-Inzidenz von 39% auf 0% " Insulitis- " von 64% auf 6% Rossini e.a 1983
KNOCHENMARKS- TRANSPLANTATION		verhindert den Ausbruch in 100% Naji e.a 1981
MILZZELL- TRANSFUSION		vermindert Inzidenz Eisenbarth 1984
PLASMAPHERESE	noch keine eindeutigen Ergebnisse Federline e.a. 1983	

Abb. 6

In einer klinischen Studie mit Cyclosporine-Behandlung (CsA) in "diabetic onset" konnte Stiller (141) eine Diabetesremission von etwa 50 % bei einer Patientengruppe erzielen. Diese und andere Befunde regten die genannte weltweite klinische Erprobung an.

Im Gegensatz zu CsA konnten mit anderen immunsuppressiven Regimen (Steroide, Azathioprin, Plasmapherese), die bei der BB/Wistar-Ratte unterschiedlich erfolgreich waren, im klinischen Versuch keine ermutigenden Ergebnisse erzielt werden (siehe Abb. 9) (32,34,60,91,95,109, 119,126,128).

Kritisch zum Konzept der immunsuppressiven Therapie ist anzumerken, daß z.B. eine prophylaktische CsA-Gabe, im Rattenmodell sehr erfolgreich (80,86), beim Menschen bisher nur schwer durchführbar ist, denn die bei einer Immunsuppression mit CsA zu beachtenden Nebenwirkungen (9,20) verbieten einen bedenkenlosen Einsatz bei allen Risikogruppen.

Außerdem liegen bisher noch keine zuverlässigen Parameter und Tests vor, um durch ein gezieltes "Screening"-Programm Risikogruppen näher einzugrenzen und die Therapie vor dem Manifestationszeitpunkt zu beginnen. Auch die bisher beobachteten Autoantikörper sind nicht zuverlässig, da sie nicht nur in Risikogruppen auftreten (57) und ihre Bestimmung immer noch mit technischen Schwierigkeiten verbunden ist.

Eine immunsuppressive Therapie nach dem "diabetic onset", wie sie momentan mit CsA versucht wird, kommt eigentlich schon zu spät, denn aus dem Tierexperiment weiß man, daß erst bei einer Reduktion der B-Zellmasse unter 10 % mit einer pathologischen Glukosetoleranz zu rechnen ist (57). Da der diabetische Zustand zum Zeitpunkt der Diagnosestellung meist schon längere Zeit besteht, ist bei der Manifestation der "Zug zum Diabetes eigentlich schon abgefahren" (57).

1.3.3. Transplantation von B-Zellgewebe

Ein weiterer therapeutischer Ansatz zum Typ I-Diabetes besteht in dem Ersatz des B-Zell-Apparates durch transplantiertes Gewebe. Hier sind prinzipiell zwei Wege denkbar:

- Transplantation von segmentalem oder gesamtem Pankreas d.h. des exo- und endokrinen Anteils zusammen
- oder Transplantation von isolierten Langerhans'schen Inseln als freies Transplantat.

1.3.4. Segmentale Pankreastransplantation

Die Transplantation eines vaskularisierten Pankreassegmentes stellt bisher die am häufigsten klinisch angewandte Methode des kompletten Ersatzes von B-Zellgewebe durch Transplantation dar. Mit einem Transplantat-Ein-Jahresüberleben von ca. 50 % (11,15,78) ist mittlerweile der Weg in Richtung klinische Routinetherapie eingeschlagen, wenngleich immer noch einige schwerwiegende technische und immunologische Probleme ungelöst sind.

1.3.4.1. Technik der Pankreastransplantation

Die Technik der Explantation des Spendeorgans ist heute weitgehend standardisiert. Die anfangs häufiger geübte Explantation des gesamten Pankreas, manchmal sogar mit duodenalem Anteil, ist heute weitgehend verlassen worden. Implantiert werden momentan in erster Linie Pankreas-schwanz-Segmente in die Regio lumbalis, mit Anastomose an die Iliacal-gefäße des Empfängers. Einige Autoren bevorzugten eine vollständig extraperitoneale Lage des Organs, andere eine teils extra - teils intraperitoneale und wieder andere eine vollständig intraperitoneale Lage des transplantierten Organs (75).

Eine weitere Variante stellt die jungst von Caine (16) vorgestellte, sogenannte paratope Pankreastransplantation dar (im Gegensatz zu den o.g. heterotopen Transplantationsorten) mit venöser Drainage des Organs in die Pfortader und arterielle Versorgung aus der A. lienalis des Empfängers.

Bei der Handhabung des exokrinen Organanteils unterscheidet man grundsätzlich zwei Wege:

Sekret-ableitende Verfahren einerseits und Pankreasgang-okklusive Verfahren andererseits.

Bei ersteren wird die Ableitung des exokrinen Sekrets durch Drainage in das Peritoneum, in die Harnblase, in den Magen oder über eine Roux-Schlinge in den Darm bewerkstelligt (75,143). Diese experimentell erarbeiteten Techniken zeigten jedoch bei klinischer Anwendung einige Probleme auf.

Eine freie Drainage des Pankreassekretes ins Peritoneum, bei Nagern und anderen Tieren problemlos, führte bei Patienten zu erheblichen Schmerzen und in einigen Fällen bei Überschreiten der peritonealen Re-

sorptionsfähigkeit zum massiven Aszites (143). Bei allen weiteren ableitenden Methoden besteht vor allem die Gefahr der Anastomoseninsuffizienz zum ableitenden System mit der Gefahr einer gleichzeitigen Aktivierung des Pankreassekrets.

Für eine Sekretableitung jedoch spricht die Verminderung lokaler Komplikationen, wie Fistel etc. und die weitgehend fehlende Organfibrose, die bei duktokklusiven Methoden auftreten kann und zu einer Reduktion des Gefäßbettes und möglicherweise zur Schädigung der Inseln führt (77).

Bei den okklusiven Methoden unterscheidet man zum einen die reine Ligatur des Ductus pancreaticus und zum anderen die Okklusion des Ganges durch Injektion von selbsthärtenden Substanzen. Dubernard (28) verwendet vorwiegend den Kunststoff Neopren, während andere Gruppen z.B. Land (77,78) in München den Polyalkohol Prolamin injizieren, der biologisch abbaubar ist und eine geringere Fremdkörperreaktion unterhält.

1.3.4.2. Probleme der Pankreastransplantation

1.3.4.3. Chirurgische Probleme

Im Vordergrund steht immer noch die Handhabung des exokrinen Anteils, von dem häufig die postoperativen Komplikationen ausgehen. Ableitende Methoden bergen hauptsächlich die Gefahr einer Anastomoseninsuffizienz, was bei Kontakt des Pankreassekrets mit Darminhalt zu schwersten autolytischen und peritonitischen Komplikationen führen kann. Die Drainage des Sekrets via offenem Ductus in die Peritonealhohle ist zwar technisch unkompliziert, ist aber wegen nicht beherrschbarer Komplikationen (Aszites) wieder verlassen worden (78,143).

Die okklusiven Verfahren werden momentan am häufigsten praktiziert, wobei jedoch die lokalen Komplikationen, wie die Entwicklung einer Pankreassekretfistel, die sich im Gefolge eines Sekretstaus des Organs entwickelt, einerseits für den Patienten eine große Belastung darstellt und andererseits das Risiko des Organverlustes durch Infektionen oder andere Komplikationen in sich birgt. Die Bedeutung der im Gefolge der exokrinen Organatrophie auftretenden fibrotischen Umwandlung des Pankreas für die Versorgung der Langerhans'schen Inseln bei dieser Technik ist ebenso nicht eindeutig geklärt.

1.3.4.4. Immunologische Probleme

Pankreasallotransplantate werden, wie experimentelle Untersuchungen ergaben (142), auf dem selben Wege wie andere Organe abgestoßen. Die abgelaufene Abstoßung läßt sich klinisch am Wiederanstieg der Blutglukosewerte feststellen. Eine temporäre Hyperinsulinämie kann vorausgehen (11). Histologisch zeigt sich ein Ödem des Pankreas mit interstitieller Hamorrhagie und lymphatischen Infiltraten. Exokriner und endokriner Anteil sind gleichermaßen betroffen (10,15b).

Experimentell wie klinisch läßt sich die Überlebenszeit des Transplantates durch den Einsatz von konventionellen Immunsuppressiva (Azathioprin, Steroide, Antilymphozyten-Serum) Cyclosporine oder Kombinationen aus beiden erfolgreich verlängern. Aus der Klinik sind Transplantat-Überlebenszeiten von mehreren Jahren (144) bekannt.

Wie bei der Nierentransplantation steht heute jedoch die Immunsuppression mit Cyclosporine im Vordergrund. Sie wird bei Bedarf durch konventionelle Medikamente ergänzt.

Im Gegensatz zur Niere ist die Früherkennung einer beginnenden Abstoßungsreaktion beim Pankreas erschwert. Auf Grund der Morphologie des Organs ist die Stanzbiopsie, bei der Niere häufig verwendet, wegen möglicher lokaler Komplikationen sehr gefährlich und oft wenig aussagekräftig, da einerseits durch die Manipulation des exokrinen Anteils unspezifische Veränderungen auftreten können und andererseits eine Aussage über Vorgänge am Inselgewebe durch eine schlechte Trefferquote unsicher ist. Da der klinische Verlauf, an C-Peptid und Insulin-Spiegelveränderungen erkennbar, oft dem lokalen Geschehen nachhinkt, ist eine frühe Erkennung der beginnenden Abstoßungsreaktion am Pankreas alleine unsicher. Bei der häufigen simultanen Transplantation einer Niere besteht die Möglichkeit einer Orientierung der immunologischen Situation anhand des Verhaltens der Niere (77,78).

1.3.5. Inseltransplantation

Die Transplantation isolierter Langerhans'scher Inseln als freies Transplantat stellt die Möglichkeit des Ersatzes von endokrinem B-Zellgewebe dar, welches sich dem exokrinen Anteil und den damit verbundenen Problemen entledigt. Bei einer klinischen Anwendung wäre der operative Eingriff ein weit kleinerer, deshalb für den diabetischen Patienten schonender. Dies würde gleichzeitig eine weitere Indikationsstellung zur Transplantation erlauben.

Im folgenden seien nun die wichtigsten Varianten und Probleme der Inseltransplantation dargestellt.

1.3.5.1. Inselgewinnung aus adultem Pankreas

Ausgangspunkt fast aller Isolationstechniken für Langerhans'sche Inseln ist die von Moskalewski 1967 (104) vorgestellte und von Lacy (73) entscheidend modifizierte Methode. Die Spenderpreparation beginnt bei Lacy im Rattenmodell mit einer Perfusion des kanulierten Pankreasganges. Durch eine so induzierte Ruptur des Gangsystems soll ein besserer Angriffspunkt für die spätere enzymatische Verdauung des Organs erreicht werden (104). Bei der darauf folgenden mechanischen Zerkleinerung des Pankreas wird auf möglichst homogene Partikelgröße geachtet, um die anschließende Wirkung des Enzymgemisches Kollagenase, gewonnen aus dem Bakterium "Clostridium histolyticum", gut kontrollieren zu können.

Aus dem nach der Einwirkung des Enzymgemisches gewonnenen Pankreas-homogenat werden nun auf unterschiedlichste Arten die Langerhans'schen Inseln isoliert.

Der einfachste Reinigungsschritt besteht in der Sedimentation des Gemisches mit nachfolgendem manuellem Herauspicken der Inseln. Wiederholt man diese mühsame Prozedur mehrmals, so erreicht man eine Transplantatpreparation, die relativ frei von Verunreinigungen ist (25,26,41,130,142).

Die Anwendung von Dichtegradienten wie Ficoll (92,133), Percoll (41) und anderen zur Separation der Inselnfraktion, erwies sich im Rattenmodell als erfolgreich. Es verblieben jedoch auch hier in der Transplantatpreparation beträchtliche lymphatische und exokrine Verunreinigungen (25,26,41,130,132) die ein nachfolgendes Handpicken der Inseln erfordern. Durch die vielen hintereinander geschalteten Arbeitsgänge bei der Dichtegradienten-Methode wird die Inselausbeute erheblich reduziert (25,26,142).

Weitere Möglichkeiten der Abtrennung von exokrinem Gewebe bestehen in der Anwendung von Velcro^R (ähnlich dem Klettverschluß) (74) zum Zurückhalten von fibrösem Material und in dem Einsatz von, die Langerhans'schen Inseln markierenden, monoklonalen Antikörpern (125, 143). Faßt man die oben nur exemplarisch geschilderten Techniken zusammen, so kann man im Nagermodell von einer zufriedenstellenden Inselausbeute sprechen. Jedoch wurde bisher meist von mehreren Spendern Inseln für nur einen Empfänger gewonnen (siehe Abb.7).

Inselausbeute nach Isolation aus einem Pankreas

Lacy e. a. (1967)	200 - 300
Ziegler e. a. (1974)	100 - 200
Malonato e. a. (1976)	100 - 200
Lacy e. a. (1979)	200
Morris e. a. (1980)	150
Theodorov e. a. (1980)	350
Perloff e. a. (1981)	250
Reece Smith e. a. (1981)	200
Sutherland (overview) (1981)	150 - 400
Selawry (1984)	6 Spender pro Transplantation

Weit schwieriger erweist sich die Situation bei der Inselgewinnung aus dem Erwachsenenpankreas größerer Säugetiere (wie Hund, Schwein, Rind) bzw. des Menschen. Die Konsistenz des Pankreas bei den genannten Spezies ist im Gegensatz zum Nager wesentlich fester und das Organ enthält weit mehr fibröse Anteile, die eine homogene, mechanische Verkleinerung und die nachfolgende enzymatische Aufarbeitung erheblich erschweren (41,142,130). Die bei der Ratte erfolgreiche Kollagenase-Ficoll-Methode wurde zwar beim Menschen (106) und in anderen Großtiermodellen (94,134,150) versucht, erwies sich jedoch als schwierig (131). Deshalb wurden eine Reihe ergänzender Versuchsansätze zur o.g. Methode durchgeführt. Eine Rupturierung des exokrinen Gewebes über den venösen Schenkel des Pankreasgefäßsystems zeigte sich bei anschließender, enzymatischer Verdauung als wirkungsvoller (27) als über das Pankreasgangsystem (73). Erfolgsversprechend erwies sich auch die Perfusion des Organs mit Enzymlösung unter Druck (51).

Wie sich aus dem Nagermodell schon andeutete (66,83), ist es auch beim Großtier möglich, mechanisch zerkleinertes Pankreas, evtl. enzymatisch aufbereitet, ohne ausgesprochene Separation von Inseln, nach funktionellen Gesichtspunkten erfolgreich zu transplantieren (51,67,102). Dieser technisch relativ einfache Ansatz, der verhältnismäßig wenig Inselgewebe verloren gehen läßt, stößt jedoch von immunologischer Seite her auf Probleme (133,142). Auch aus chirurgischer Sicht sind hier Komplikationen denkbar. Bisherige klinische Versuche mit dieser Methode erfüllten nicht die aus den experimentellen Befunden gestützten Erwartungen (144,148).

1.3.5.2. Inselgewinnung aus fötalem oder embryonalem Pankreas

Einen Weg die Probleme, die mit dem exokrinen und fibrösen Anteil des adulten Pankreas assoziiert sind, zu umgehen, stellt die Möglichkeit der Inselgewinnung aus embryonalem bzw. fötalem Gewebe dar. Das

Verhältnis von exokrinem zu endokrinem Anteil ist schon bei neonatem Pankreas mit 11% Absolutanteil eindeutig zugunsten des endokrinen verlagert. Das erwachsene Organ hingegen enthält nur ca.4 Gewichtsprozent Inselmasse (142). Das Verhältnis bei embryonalem Gewebe liegt noch günstiger. Außerdem scheint dieses Inselgewebe die Potenz zu besitzen, in vivo und in vitro zu wachsen (96,105,142). So könnte die bisher schlechte Inselausbeute der o.g. Isolationsmethoden kompensiert werden. Im Gegensatz zur adulten Insel muß das embryonale Gewebe jedoch erst ausreifen und "lernen" auf den Glukosereiz adäquat zu reagieren. Deshalb dauert es einige Wochen bis transplantiertes, embryonales Inselgewebe einen Diabetes regulieren kann (17,18,55,96, 97,101,105,142).

Diese Tatsache erschwert bei allogener Transplantation die Diagnosestellung einer Abstoßung, da bei nicht einsetzender Insulinsekretion, einerseits Transplantatabstoßung, andererseits auch eine gar nicht erst in Gang gekommene Insulinsekretion durch fehlendes Ausreifen embryonalen Gewebes die Ursache sein könnten.

1.3.5.3. Inseltransplantation - Platzierung des Inselgewebes beim Empfänger

Bei der Wahl des günstigsten Transplantationsortes beim Empfänger wären mehrere Punkte zu berücksichtigen.

Der ideale Ort sollte mit geringem Operationsrisiko verbunden und operationstechnisch leicht erreichbar sein. Eine gute vaskuläre und metabolische Versorgung der Inseln sollte bestehen, sowie eine hohe Effektivität bei der Normalisierung der diabetischen Stoffwechsellage garantiert werden. Zusätzlich müssen auch noch die Besonderheiten der verschiedenen Transplantatpräparationen berücksichtigt werden (z.B. hohe Partikelgröße bei der Transplantation ungereinigter Pankreasmikro-

fragmente). Wie entscheidend es ist, mit dem Transplantationsort möglichst den Normalzustand zu imitieren, bleibt bisher noch ungeklärt (41), wenngleich einiges für diese Hypothese spricht (134).

Die ersten Inseltransplantate wurden in die Peritonealhöhle (73,123) plaziert, doch man erkannte schon bald, daß eine intraportale Injektion von Inseln, die sich über eine Mikroembolisation gleichmäßig in der Leber verteilen (63,64) zu einer guten Vaskularisierung (52) und Ernährung der Inseln und somit einem besseren Transplantationsergebnis als bei intraperitonealer Injektion führt.

Die intraportale Inseltransplantation, die eine sehr effektive Regulation des Diabetes bewirkt, ist jedoch nur als Injektion von isolierten Langerhans'schen Inseln möglich. Ungereinigte Pankreasmikrofragmente, bei Transplantation am Hund erfolgreich, erweisen sich bei Injektion in die V. portae beim Menschen und beim Großtier problematisch (142,153,157). Als Alternative mit portaler Insulindrainage erprobte man deshalb die Milz als Implantationsort. Im Rattenmodell (38) sowie beim Hund (2,43,51) war dieser Ansatz erfolgreich, jedoch ergaben sich bei der klinischen Anwendung wiederum Probleme (41). In experimentellen Modellen werden zur Zeit noch andere Möglichkeiten portaler Insulindrainage wie z.B. Implantation in das Mesenterium oder Omentum erprobt (41).

Von den heterologen Transplantationsorten ohne portale Insulindrainage wird am häufigsten beim Nager die Implantation unter die Nierenkapsel vorgenommen, nicht zuletzt wegen der guten Erreichbarkeit des Transplantates für eine histologische Aufarbeitung (72). Ähnlich dem Hoden scheint dieser Transplantationsort gegenüber anderen zusätzlich immunologisch begünstigt zu sein (13,49). Noch einige andere heterotope Orte wurden versucht, z.B. Hirnventrikel, intramuskular etc., die alle keine erwähnenswerten Ergebnisse erbrachten.

1.3.5.4.1. Konventionelle Immunsuppressiva

Die konventionellen Immunsuppressiva Azathioprin und Prednison sowie andere Kortikoide, die klinisch sowohl bei der Nieren- wie bei der segmentalen Pankreastransplantation erfolgreich eingesetzt werden, zeigen bei der Inseltransplantation alleine oder in Kombination nicht die erwartete Wirkung (4,45,136,139,142).

1.3.5.4.2. Anti-Lymphozyten-Globulin (= ALG)

Der Einsatz von ALG und seiner Abkommlinge (z.B. Anti-Thymozyten-Globulin) bewirkt im Rattenmodell bei allogener Transplantation über eine starke wie schwache Histoinkompatibilität (53) eine wirksame Verlängerung der Transplantatüberlebenszeiten (5,12,40,68,69,71,142). Auch beim Großtier bestätigt sich diese Tendenz (93,100,134).

Das Applikationsregime der verschiedenen Autoren schwankt teils erheblich. Doch in dieser Vielzahl von Versuchen bestätigt sich fast überall die positive Wirkung von ALG. Auch der kombinierte Einsatz von konventionellen Immunsuppressiva war erfolgreich (142).

Im Hinblick auf eine klinische Anwendung ist permanente Applikation von ALG, das bei der Inseltransplantation anhand der experimentellen Ergebnisse am wirkungsvollsten erscheint, schwer durchzuführen. Eine Dauertherapie müßte aus kurz aufeinanderfolgenden intravenösen Einzelinjektionen durchgeführt werden, wobei erhebliche Nebenwirkungen (z.B. Allergien) zu erwarten wären.

1.3.5.4.3. Cyclosporine (CsA)

Cyclosporine (Sandimmun^R), das bereits sehr erfolgreich mit der segmentalen Pankreastransplantation experimentell wie klinisch angewendet wird, zeigte als Immunsuppression bei der allogenen Inseltransplantation bisher nur sehr unterschiedliche Wirkung. Besonders bei Transplantation über eine starke Histoinkompatibilität (53) lagen die Überlebenszeiten deutlich unter denen vergleichbarer segmentaler Pankreastransplantate (4,5,21,45,48,129,142,155). Bei schwacher Histoinkompatibilität fand sich ein günstigerer Effekt (129). Unserer Arbeitsgruppe (25,26) gelang es erstmals durch Cyclosporine-Therapie eine deutliche Verlängerung der Transplantat-Überlebenszeit an einem starken Abstoßungsmodell zu erzielen.

Ähnlich den Experimenten zur ALG-Therapie sind auch die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen, die Cyclosporine anwendeten, nur schwer vergleichbar. Es überrascht nur, das Cyclosporine beim segmentalen Pankreastransplantat gute Wirkung zeigt, beim Inseltransplantat aber nur eine reduzierte Wirkung besitzen soll.

1.3.5.4.4. Immunalteration

Ausgehend von der auf experimentelle Befunde gestützten Hypothese, daß sogenannte "Passenger"-Leukozyten bzw. "Dendriten-Zellen" und andere Vertreter der leukozytären Reihe, die sich im Binnenbereich der Langerhans'schen Insel aufhalten können, die Transplantatabstoßung über eine Antigenpräsentation einleiten, überlegte man sich Möglichkeiten, diese gezielt bereits in vitro zu eliminieren. Die Möglichkeit einer mehrtägigen Kultur der Inseln ermöglicht eine derartige Manipulation des zu transplantierenden Gewebes (76).

Alleinige Zellkultur für einen bestimmten Zeitraum kombiniert mit ALG (125), hohe Sauerstoffkonzentrationen bei mehrtägiger Kultur (15,70), monoklonale Antikörper gegen Ia-antigenträgende Zellen oder den Dendriten-Zellen (72), UV-Bestrahlung (58,76,79) und die Induktion von immunologischer Toleranz (37) beim Empfänger von Transplantaten führte über die Zerstörung dieser "Passenger"-Zellen zu einer erfolgreichen Verlängerung dieser nach in vitro-Manipulation transplanterter Inseln.

Noch ist nicht endgültig geklärt, ob auch beim Großtier bzw. beim Menschen, Dendriten-Zellen oder Ia-antigenträgende oder präsentierende Zellen in den Langerhans'schen Inseln zu finden sind und welche Rolle sie spielen. Beim Hund gibt es bereits erste Hinweise (47) für ihre Existenz, beim Menschen wird noch danach gesucht.

1.3.5.4.5. Immunisolation

Eine weitere Möglichkeit, die Abstoßung von transplantiertem Inselgewebe zu verhindern, liegt in der Isolation des Transplantates vom immunologischen Geschehen mittels mechanischer Barrieren, die eine Diffusion von Insulin und Nährstoffen einerseits ermöglicht, eine Einwanderung von zerstörerischen Zellen andererseits jedoch verhindern soll (21,41,142,151,152). Zur Isolation verwendet wurden bisher sogenannte Inselkammern aus Milipore^R-Filtern (41), andere Kunststoffe oder aber auch aus biologischen Substanzen. Bisher publizierte Ergebnisse sind teilweise sehr unterschiedlich erfolgreich. Das Hauptproblem hierbei liegt in einer, durch die Fremdkörperreaktion ausgelösten Diffusionsstörung um die Kammern, die zu einer Mangelversorgung der Inseln in der Kammer führt. Eigene Versuche ergaben, daß eine längerfristige Isolation von Inseln in einem Agarblock im Gegensatz zu Kunststoffkörpern möglich ist.

1.3.5.5. Bedeutung der autoimmunologischen Vorgänge beim Diabetes für transplantiertes Inselgewebe

Den ersten Hinweis für ein Übergreifen der Grunderkrankung auf transplantiertes Inselgewebe fand Sutherland (145,147) bei der segmentalen Pankreastransplantation diabetischer eineriger Zwillinge. Der transplantierte Zwilling entwickelte nach einem diabetesfreien Intervall mit einer bestimmten Latenz wieder eine diabetische Stoffwechsellaage. Mit Immunsuppression jedoch, ließ sich bei einem zweiten diabetischen Zwillingsspaar die Zerstörung der Inseln verhindern (32,145). Auch bei anderen klinischen segmentalen Pankreas-transplantationen sowie im experimentellen Modell der BB-Wistar-Ratte finden sich Hinweise für eine autoimmunologischer Zerstörung transplantierten Pankreas bzw. Inselgewebe (108,109). Das Wiederauftreten einer autoimmunologischen Glomerulonephritis in einem Nierentransplantat (81) zeigt, daß solche Vorgänge eben auch bei allogenen Transplantationen möglich sind. Ebenso fanden sich nach allogener Pankreastransplantation Hinweise für eine mögliche Transplantaterstörung durch den autoimmunologischen Grundprozeß (138,146, 147). Von welcher Bedeutung die Autoimmunitätslage für Transplantate ist und wie sich evtl. die Folgen am besten unterdrücken lassen, ist bisher nicht hinreichend geklärt.

1.3.6. Zusammenfassung der Therapiekonzepte

In der Insulintherapie, die trotz erheblicher methodischer Verbesserungen die Entwicklung der typischen diabetischen Spätkomplikationen nicht verhindern kann, bleibt heute die segmentale Pankreastransplantation, trotz ihrer vielen erheblichen Probleme, die derzeit bedeutendste Alternative für eine chirurgische Therapie beim Typ-I-Diabetes.

Zwar werden über die Immunsuppression mit Cyclosporine auch im "diabetic onset" aufsehenerregende Ergebnisse berichtet, doch bestehen für diese Behandlungsform noch immer die Probleme der erheblichen Nebenwirkungen (9,20) und des noch nicht möglichen prophylaktischen Einsatzes bei Risikogruppen. Die Therapie setzt deshalb sehr spät, wenn nicht zu spät, ein.

Die Transplantation von isolierten Langerhans'schen Inseln wäre das naheliegende Therapiekonzept, das den kleinsten chirurgischen Eingriff aufweist und deshalb auch für eine weite Indikationsstellung geeignet wäre. Doch es sind vorwiegend technische (mangelhafte Ausbeute, schwierige Isolation und Aufbereitung) und immunologische Probleme (noch keine wirkungsvolle Immunsuppression, ungelöste Rolle der autoimmunologischen Prozesse), die eine klinische erfolgreiche Anwendung in naher Zukunft wenig wahrscheinlich machen, obwohl die experimentellen Ergebnisse ermutigend sind.

2. Praktischer (experimenteller) Teil

2.1. Problemstellungen

Die beiden Grundprobleme, die eine klinische Anwendung der Inseltransplantation bisher erschweren, sind einerseits die geringe Ausbeute gereinigter Langerhans'scher Inseln, die mit den meisten Isolations-techniken erreicht wird, und andererseits das Fehlen eines praktikablen und effektiven immunsuppressiven Konzepts zur Prävention der allogenen Abstoßung. Welche Bedeutung nun der zusätzlich bestehende Autoimmunprozeß beim Diabetes für den Erfolg von Inseltransplantationen hat, soll anhand von Transplantationsversuchen im autoimmunologischen Diabetesmodell der BB/Wistar-Ratte untersucht werden. Die Inseltransplantate werden mit einer Modifikation bisheriger Isolationstechniken gewonnen, die das Ein-Spender/Ein-Empfänger-Konzept wie bei klinischen Transplantationen ermöglicht. Das bei der segmentalen Pankreastransplantation und bei der immunsuppressiven Therapie im "diabetic onset" erfolgreiche Cyclosporine soll auch in diesem Modell auf seine Wirkung überprüft werden.

Folgende Fragestellungen sollen untersucht werden:

2.1.1. Suffizientes Ein-Spender/Ein-Empfänger-Konzept im BB-Wistar-Modell

Gelingt es mit einem Ein-Spender/Ein-Empfänger-Konzept die Stoffwechsellage der spontan-diabetischen BB/Wistar-Ratte suffizient zu normalisieren?

Im Gegensatz zu anderen experimentellen Modellen besteht hier als Ausgangspunkt eine extreme diabetische Situation, die eine strikte Insulintherapie vor Transplantation erfordert.

2.1.2. Inseltransplantation im Früh- und Spatstadium des Diabetes

Welche Bedeutung hat der Transplantationszeitpunkt bzw. das Diabetesstadium für ein Überleben transplanzierter Inseln?

Beim Menschen und der BB/Wistar-Ratte ändert sich die Autoimmunitätslage im Verlauf des Diabetes gleichermaßen. Es besteht ein Maximum um die Zeit des "diabetic onset". Im weiteren Verlauf reduziert sich die autoimmunologische Aktivität, wie sich z.B. aus dem Verlauf von Autoantikörpern erkennen läßt (56,57,98).

Transplantation von eineiigen Zwillingen (145) und Inseltransplantation bei der BB/Wistar-Ratte (108,109) zeigten, daß Transplantate, auch bei ausgeschalteter Histoinkompatibilität, von der bestehenden Grundkrankheit zerstört werden können. Es soll geklärt werden, ob sich die Autoimmunitätslage beim Empfänger auf die Überlebenszeit von Inseltransplantaten auswirken kann.

2.1.3. Postoperative Immunsuppression mit Cyclosporine

Läßt sich durch eine postoperative Immunsuppression mit Cyclosporine eine Verlängerung der Überlebenszeit von "pseudo"-isogenen und allogenen Inseltransplantaten erreichen?

Im Streptozotocin-Modell (toxisch) gelang es bei Transplantation über eine starke Histoinkompatibilität durch Cyclosporine-Gabe eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeiten von Inseltransplantaten zu erzielen (25,26). Vergleichend soll nun im BB/Wistar-Modell bei gleicher Histoinkompatibilität die Wirkung der postoperativen Cyclosporine-Therapie untersucht werden. Bei "pseudo"-isogenen Inseltransplantaten soll geklärt werden, ob sich die autoimmunologische Zerstörung von Inseln durch Immunsuppression mit Cyclosporine günstig beeinflussen läßt.

2.1.4. Auswirkungen einer zusätzlichen präoperativen Immunsuppression mit Cyclosporine

Kann eine zusätzliche präoperative Immunsuppression mit Cyclosporine die autoimmunologische Ausgangslage im Sinne einer Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit günstig beeinflussen?

Die Ergebnisse der Cyclosporine-Immunsuppression im "diabetic onset" (80,86,141) ergaben, daß es diesem Medikament möglich ist, die bestehende Autoimmunitätslage günstig zu beeinflussen. Deshalb sollte untersucht werden, ob durch die zusätzliche präoperative CsA-Iherapie die Überlebenszeit von Inseln noch weiter verlängert werden kann.

2.1.5. Zusammenfassung

Alle obigen Fragestellungen wurden an kurz- und langzeit-diabetischen Empfängern jeweils untersucht. Gleichzeitig wurden allogene und "pseudo"-isogene Transplantationen durchgeführt und miteinander verglichen, um auch den allogenen Aspekt im Hinblick auf eine klinische Relevanz zu berücksichtigen.

2.2. Material und Methoden

2.2.1. Verwendete Rattenstämme

2.2.1.1. Die Lewis-Ratte

Dieser Stamm geht auf Zuchtungen des Wistar-Instituts zurück (39). Der genetische Haplotyp wird mit K^l 11 bezeichnet (53). Die verwendeten Tiere wurden vom Zentralinstitut für Versuchstierkunde in Hannover bezogen. Als Spender wurden Tiere männlichen und weiblichen Geschlechts zwischen 200 und 300 g benutzt.

2.2.1.2. Die BB/Wistar-Ratte (siehe auch 1.2.6.)

Dieser Stamm leitet sich von der Wistar-Furth-Ratte (K^l 1u) ab und wurde 1974 in den Bio Breeding ("BB") Laboratories der Sir Frederik Banting Society, Health Protection Branch, Animal Resources Division, Ottawa, Ontario, Canada, entdeckt. Diese Abteilung wird von Dr. Thibert geleitet, dessen freundlichem Entgegenkommen wir die Zusendung von 40 Ratten dieses kostbaren Stammes verdanken. An dieser Stelle muß auch die Unterstützung von Prof. Dr. M. MacAuley aus dem Dept. of Pathology in Halifax, Nova Scotia erwähnt werden, ohne dessen Hilfe kein Kontakt nach Ottawa entstanden wäre.

In den Einrichtungen des Instituts für Chirurgische Forschung der LMU München wurde nun eine eigene BB/Wistar-Kolonie gezüchtet. Als Spender für die Inseltransplantationen wurden 200 bis 300 g schwere nicht-diabetische männliche und weibliche Tiere der Kolonie verwendet. Empfänger waren diabetische männliche Tiere im Gewichtsbereich 200-250 g.

2.2.2. Chemikalien und Medikamente

Verwendet wurden:

Atropin - 0,5 mg/ml, Drobenä Berlin, BRD

Cyclosporine (Sandimmun^R, Sandoz, Basel, Schweiz)

Desoxyribonuclease - Sigma-Chemie, Unterhaching, BRD

Di-Ethyl-Ether (pro-narcosi) - Höchst AG, Frankfurt, BRD

Dobutrex^R - Lilly, Giessen, BRD

Foetales Kälberserum - Boehringer, Mannheim, BRD

Glukose-10 %, 50 % - B. Braun, Melsungen, BRD

Hank'sche Lösung - ohne Kupfer, Phosphat, Phenolrot, Apotheke der klinischen Universitätsanstalten, LMU Großhadern, BRD

Insulin - Depot-Insulin CS, Hoechst AG, Frankfurt, BRD

Keto-Diabur^R-Stix (Urinstix) - Boehringer, Mannheim, BRD

Kodan-Spray^R - Firma S+M, Norderstedt, BRD

Kollagenase - von Clostridium histolyticum (0,6-0,8 IU/mg), Serva-Chemie, Heidelberg BRD

Kulturmedium - RPMI 1640, Gibco-Mycen, Karlsruhe, BRD

500 ml enthalten:

10 ml 1M Hepes

5 ml Antibiotikum

5 ml Antimykotikum

1 m Sulfomycin

5 ml Na-Pyruvat

200 µl Mercaptoethanol

Vitamine (alles von Gibco)

+ 10 % foetales Kälberserum

Neutral-Rot (3-amino-m-dimethylamino-2-methyl-phenacinydrochlorid)-Sigma-Chemie, Taufkirchen, BRD

Nobecutan^R-Spray - Astra Pharma, Wedel, BRD

Totocillin^R - Bayer AG, Leverkusen, BRD

Trasyloi^R - Bayer AG, Leverkusen, BRD

2.2.3. Allgemeine Methodik

2.2.3.1. Gewichtsmessung

Bei allen Tieren der BB/Wistar-Kolonie sowie allen transplantierten Tieren wurden tägliche Gewichtsmessungen (Waage: PB 3000, Mettler, Wetzlar, BRD) durchgeführt und neben Blut- und Urinzuckerwerten tabellarisch vermerkt. Die Messungen wurden standardisiert jeweils um 9.00 Uhr morgens in gleichbleibender Reihenfolge durchgeführt.

2.2.3.2. Blutzuckerbestimmung

Die Ratte wird hierzu mit Di-Ethyl-Ether narkotisiert und auf ein Korkbrett (30x50) fixiert. Die Schwanzspitze wird mit Kodan-Spray^K desinfiziert und mittels eines Skalpell (Nr.20 Feather, Japan) abgeschnitten oder angeritzt. 100 µl Frischblut werden entnommen und zu 900 µl Uranylacetatlösung in entsprechende Aliquots (Greiner, Nürtingen, BRD) gegeben. Zur Blutstillung wird der Schwanz mit einem resorbierbaren Faden (Vicryl 3.0 Ethicon, Norderstedt, BRD) abgebunden.

Die Blutglukosewerte werden nach der Glukosedehydrogenasemethode mit einem Autoanalyser (Modell Eppendorf, ACP 50/40, Eppendorf AG, Hamburg, BRD) bestimmt. Bei allen Blutzuckerbestimmungen hatten die Tiere freien Zugang zum Futter.

2.2.3.3. Glukosetoleranztest

Dieser Test wurde als intravenöse Gabe von 1 g Glukose/kg Körpergewicht durchgeführt. Zum Zeitpunkt 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 Minuten wurde in Narkose Blut für Glukosebestimmungen und parallel für Insulinmessungen entnommen. Bei transplantierten Tieren wurden diese Tests am 15. post-operativen Tag durchgeführt.

2.2.3.4. Insulinbestimmung

Die Insulinbestimmung wurde aus Rattenserum mittels eines käuflichen Insulin-RIA (Amersham und Buchler, Braunschweig, BRD) bei PD Dr. Teichmann im Endokrinologischen Labor der Chirurgischen Klinik Großhadern durchgeführt.

2.2.3.5. Glukose- und Ketonbestimmung im Urin

Als Diabetesscreening und zur Kontrolle der Insulintherapie bei diabetischen BB-Ratten wurden Glukose- und Ketonkörper semiquantitativ mittels Urinstix (Ketodiabur^R) bestimmt. Hierzu wurde der Urin durch Kompression der Blase von auf dem Rücken liegenden Ratten gewonnen. Diese Prozedur war teils mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden und manchmal führte erst das Baden der Rattenhinterbeine mit kaltem Wasser zum Erfolg.

2.2.3.6. Narkose und OP-Vorbereitung

Zur Operation bzw. Blutentnahme und für den Glukosetoleranztest wurden alle Tiere mit Di-Ethyl-Ether narkotisiert. Nach Erreichen des Toleranzstadiums III (nach Guedel) wird die anästhesierte Ratte aus dem Ethertopf auf eine Korkplatte aufgebracht und dort fixiert. Eine Ethermaske, die die Atemwege der Ratte umgibt, bewirkt eine Fortführung der Narkose. Bei Operationen und längeren Narkosen wird zusätzlich 0,2 ml einer Atropinlösung subkutan injiziert, um eine verstärkte Bronchialsekretion oder einen Spasmus zu verhindern.

Vor Operationen werden alle Tiere in Narkose mit einer elektrischen Schermaschine (Aesculap, Tuttlingen, BRD) im Inguinal- und Bauchbereich enthaart und anschließend mit Kodan-Spray^R desinfiziert.

2.2.3.7. Statistische Untersuchungen

Die erzielten Transplantationsergebnisse wurden statistisch mit Hilfe des "Log-Rank-Test" nach Peto und Pike (117,118) untersucht. Bezüglich der Überlebenszeit wurden "pseudo"-isogene und allogene Inselempfänger verglichen. Als weitere Einschränkungen des Tests wurden die Parameter Therapie und Stadium des Diabetes etabliert. Bestehende Unterschiede zwischen den Gruppen wurden auf Signifikanz überprüft. Diese Untersuchungen wurden am ISB der LMU München mit freundlicher Unterstützung von Herrn PD Dr. Köpcke vorgenommen.

2.2.4. Spezielle Methodik

2.2.4.1. BB/Wistar-Kolonie München

Im September 1984 kamen 40 Tiere von der Originalkolonie der Bio-Breeding Laboratories in Ottawa nach München. Sie sollten den Ausgangspunkt für eine eigene Münchner BB/Wistar-Kolonie bilden.

2.2.4.1.1. Tierhaltung

Wie schon im theoretischen Teil beschrieben, sind BB/Wistar-Ratten auf Grund ihres Defekts im Lymphozytensystem besonders empfindlich für Infektionen jeglicher Art. Nach Ausbruch des Diabetes mellitus gilt dies noch im verstärkten Maße. Deshalb sind zur Haltung und Zucht besondere hygienische und klimatische Rahmenbedingungen notwendig.

Aus diesem Grund wurde die Kolonie in einem separaten Raum untergebracht, der nur nach vorherigem Umkleiden, Anlegen von Überschuhen und Händedesinfektion, betreten wird. Klimatisation des Raumes, eine konstante Temperatur von 25°C und eine relative Luftfeuchtigkeit von etwa 20% werden angestrebt. Für die Ratten wird ein künstlicher Tag-Nachtrhythmus von jeweils 12 Stunden simuliert, der täglich um 9.00 Uhr beginnt. Die Rattenkäfige werden zweimal wöchentlich gereinigt und einmal die Woche im Zuchtraum gassterilisiert (Ethylenoxid).

Alma H 1003^R Rattenfutter (Kempten, BRD) wird zur Fütterung verwendet, der Flüssigkeitsbedarf durch normal aufbereitetes Trinkwasser gedeckt.

Als besondere hygienische Maßnahme werden schwangere Weibchen und neugeborene Jungtiere im "Laminar-Air-Flow" (Ceaq, Schirp, Bork, BRD) gehalten.

2.2.4.1.2. Züchtung der BB-Ratte

Auf Grund der kombinierten Vererbung des Diabetes durch zwei voneinander unabhängige Gene (siehe 1.2.6.), die sich nicht streng nach den Mendel'schen Gesetzen verhalten, ist es notwendig für jedes Tier einen Kurzstammbaum zu vermerken. Dabei wird aufgetretener Diabetes bei Eltern und Großeltern sowie beim Tier selbst vermerkt. Anhand dieser Daten werden nun die Zuchtpärchen ausgewählt zu:

- a) "high-risk-Gruppen" - beide Eltern diabetisch
- b) "medium-risk-Gruppen" - ein Elternteil diabetisch und mindestens einer der beiden Vorfahren des zweiten Elternteils diabetisch
- c) "low-risk-Gruppen" - beide Elternteile nicht diabetisch aber mindestens ein diabetischer Großelternteil.

Bei langerbestehender strenger Inzucht kann eine sogenannte Inzuchtdepression auftreten, die durch erhöhte Infektanfälligkeit, Anstieg der Letalität und schlechte Fortpflanzungstendenz gekennzeichnet ist. In so einem Fall kann es nötig werden, Tiere aus der nicht-diabetischen BB/Wistar-Kontrollgruppe in die Weiterzucht einzugliedern.

2.2.4.1.3. Screening und Einstellung des Diabetes

BB/Wistar-Ratten entwickeln etwa um den 60. Tag Diabetes mellitus mit Hyperglykämie, Glukosurie, Polydipsie und Polyurie. Vom Zeitpunkt der klinischen Manifestation an besteht eine absolute Notwendigkeit zur Insulintherapie, da diabetische Tiere in der Folge sonst sehr schnell in der Ketoazidose sterben. Deshalb wurde ab dem 50. Lebenstag jedes Tier einer Generation nach folgendem Schema überwacht:

- Bei allen nicht-diabetischen Tieren wurde jeden 2. Tag das Gewicht kontrolliert und der Urin auf Glukose geprüft.
- Diabetische Tiere wurden täglich auf Glukose im Urin kontrolliert, das Gewicht und bei zweifelhaften Befunden der Blutzucker bestimmt.
- Transplantierte Tiere wurden dreimal wöchentlich auf Glukose im Urin überprüft und der Blutzucker bestimmt.

Die Insulintherapie wird anhand des Screenings orientiert und folgendermaßen festgelegt:

Als Anfangsdosis werden für Männchen 2,4 Einheiten und für Weibchen 2,0 Einheiten eines Depot-Insulins (Depot Insulin CS, Hoechst, Frankfurt, BRD) gegeben. Bei erneuter Glukosurie am Tag nach der ersten Insulingabe, erhöht sich die Dosis um jeweils 0,2 Einheiten. Liegt zusätzlich Positivität auf Ketonkörper vor, so wird um insgesamt 0,4 Einheiten erhöht. Auf negative Uringlukose folgt eine Dosisreduktion um eine Einheit.

Um eine gleichmäßige Wirkung des Depot-Insulins zu gewährleisten und die Gefahr von Hypo- bzw. Hyperglykämie möglichst gering zu halten, wurde die Tagesdosis genau 3 Stunden nach Beginn der Helligkeitsphase, also immer zur gleichen Zeit gegeben. Das Insulin wurde subkutan in die Bauchhaut nach vorheriger Desinfektion injiziert.

Um die sehr geringe Insulinmenge bei Therapiebeginn besser abmessen zu können und so eine genauere Dosierung zu ermöglichen, wurde das vom Hersteller gelieferte Insulin mittels einer hierfür geeigneten Verdünnungslösung (saure isotone Surfen-Lösung 0,17 mg/ml) im Verhältnis 1:5 verdünnt.

Für die folgenden Transplantationsversuche wurden nun als diabetisch alle Tiere definiert, die an 5 aufeinander folgenden Tagen mit ansteigender Dosis insulinpflichtig waren. Bei allen Tieren, die diese Kriterien erfüllten, konnte keine Remission des Diabetes gefunden werden.

2.2.4.1.4. Populationsdaten (siehe Abb.8)

Ausgangspunkt der Münchner Kolonie war die Generation 0 mit 40 Tieren und einer Gesamt-Diabetesinzidenz von 47,5 % bei einer Letalität von 2,5%. Generation 1 umfaßte bereits 90 Tiere mit einer Diabetesinzidenz von 52,2 % und einer Letalität von 3%. Die Generation 2 besteht aus 124 Tieren und die vorläufige Diabetesinzidenz beträgt 41,2% (diese kann sich noch erhöhen). Von der Generation 3 und 4 liegen noch keine genauen Daten vor.

Das mittlere Alter beim "diabetic onset" beträgt 97 ± 13 Tage. Kein Tier wurde vor dem 58. und nach dem 110. Tag diabetisch.

2.2.4.1.5. Probleme bei der Haltung der BB-Wistar-Ratte (vergl. 1.2.6.)

Wie oben erwähnt, stehen die häufig auftretenden Infektionen und die nach mehreren Generationen auftretende sogenannte Inzuchtdepression im Vordergrund. Ein weiteres Problem stellt die suffiziente Einstellung von Tieren mit starker Tendenz zur Ketoazidose dar. Hier mußte die Insulindosis meist erheblich schneller gesteigert werden als im Therapieschema festgelegt. Einige dieser Tiere mußten zusätzlich infundiert werden.

BB/WISTAR KOLONIE MÜNCHEN

seit September 1984: Tierhaltung in Grosshadern

Bezugsquelle: Dr.P Thibert, Animal Resources Division, Health Protection Branch, Ottawa, Ontario, Canada

Population:	Individuenzahl	Diabetesinzidenz	Letalität	Ursachen
Generation 0	n = 40	47,5%	1%	Infektionen, Ileus durch Megacolon Ketoacidose
Generation 1	n = 90	52,2%	3%	
Generation 2	n = 124	41,2%		

mittleres Alter beim "onset": ▶ 97 ± 13 Tage

▶ kein Diabetes vor dem Tag 58 und nach Tag 110

Remissionen: ▶ keine nach 5 Tagen insulinpflichtigem Diabetes

Verlaufsformen: ▶ sofort hoher Insulinbedarf – häufig Keton positiv

▶ langsamer Anstieg der Insulindosis

▶ längere Zeit grenzwertig diabetisch – später zunehmender Insulinbedarf

Probleme: ▶ suffiziente Einstellung keto-azidotischer Ratten

▶ Betreuung diabetischer Mütter

▶ richtige Dosierung – bei geringen Insulinmengen schwierig

▶ Tagesrhythmik

▶ Zucht

Die Betreuung diabetischer Mütter während der Schwangerschaft und nach der Geburt von Jungen und die adäquate Anpassung der Insulindosis erwies sich als schwierig.

Ein weiteres Problem bestand im richtigen Abmessen der sehr kleinen Insulinmengen zu Therapiebeginn.

2.2.4.2. Inselisolation

Die im folgenden beschriebene Isolationsmethode, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde, basiert auf der von Lacy im Rattenmodell zuerst beschriebenen (73). Die wesentliche Veränderung beruht auf einer intravitalen Perfusion des Pankreas mit Neutral-Rot-Lösung, die nach Bensley (6) zu einer Vitalfärbung der Langerhans'schen Inseln führt. Auf eine Dichtegradienten-Zentrifugation wurde hier bewußt verzichtet. Alle folgenden Schritte erfolgten unter sterilen Arbeitsbedingungen.

Das Abdomen des Spendertiers wurde in der Medianlinie eröffnet. Nach Mobilisation des Magens, der Milz und des Duodenums wurden beide Nierenarterien aufgesucht und elektrokoaguliert (Koagulator t-20, Aesculap, Tuttlingen, BRD). Die abdominale Aorta wurde von der Bifurkation nach proximal bis zur Mesenterialarterie (bei der Ratte meist nur eine) präpariert und nahe der Bifurkation mit einem Teflon-Katheter (65-12, 18G Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, BRD) kanüliert. Die Mesenterialwurzel wurde mit einer großen Klemme breitbasig abgeklemmt. 40 ml eisgekühlter Neutral-Rot-Lösung (0,08 mg/ml gelöst in Hank'scher Lösung(6)) wurden danach über die kanülierte Aorta zur selektiven Perfusion des Pankreas langsam injiziert (siehe Abb. 9). Das Pankreas färbt sich zuerst zartrosa später tiefrot (Abb.10). Das angrenzende Fettgewebe verbleibt ungefärbt und ist somit leicht zu identifizieren und später abzutrennen (Abb. 11). Das Pankreas wird nach homogener Anfärbung aus dem Gewebsverband exzidiert, von Milz und umgebendem Fett befreit und in einer Petrischale auf Eis gelagert.



Abb. 9



Abb. 10

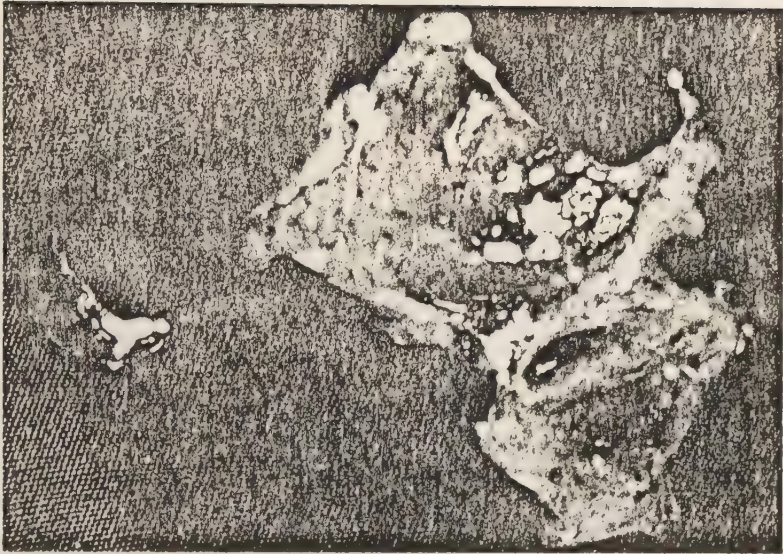


Abb. 11

Das so präparierte Organ wird nun vor der enzymatischen Verdauung mittels zweier parallel laufender Scheren auf eine Partikelgröße von 1 bis 3 mm verkleinert. Diese Fragmente werden in ein thermostatisierbares Rührgefäß (Wheaton, Millville, New Jersey, USA) eingebracht. Das Gefäß wird mit einem 37° C warmen Wasserbad verbunden (Abb.12).

Die Kollagenase-Enzymlösung wird unmittelbar vor dem Versuch zubereitet. 12 I.U. Kollagenase pro Pankreas werden hierzu in 4 ml Hank'scher Lösung angerührt und zum zerkleinerten Pankreas zugegeben. Das ganze Gemisch wird nun ca. 5 bis 10 Minuten bei etwa 1000 Umdrehungen pro Minute (Upm) inkubiert. Um den Grad der enzymatischen Verdauung kontrollieren zu können, wird jede Minute eine Probe aus dem Gemisch entnommen und unter dem Stereomikroskop (Zeiss, Oberkochen, BRD) betrachtet. Ein optimaler Verdauungsgrad ist dann erreicht, wenn die ziegelrot-gefärbten Inseln gänzlich frei von umgebendem exokrinem

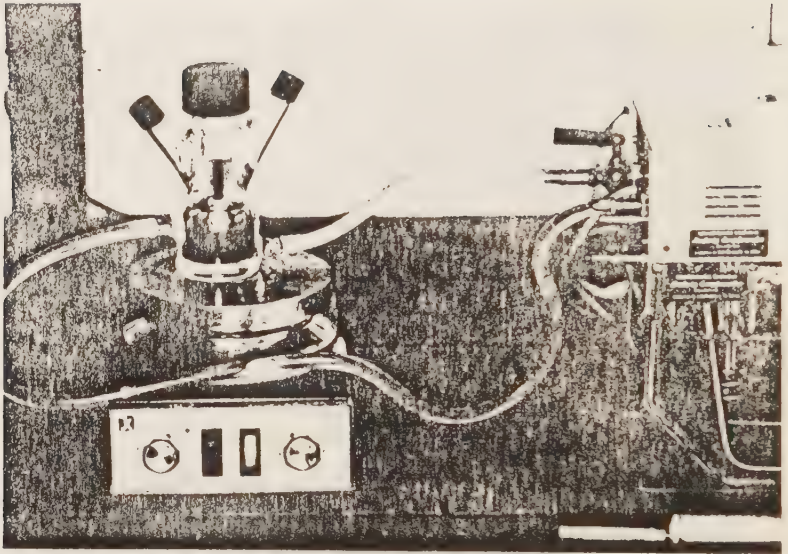


Abb. 12

Gewebe sind. Durch Zugabe von 50 ml etwa 4° C kalter Hank'scher Lösung, die 400 I.U./ml Trasylol^R enthält, wird die Verdauungsreaktion gestoppt. Der gesamte Ansatz wird anschließend in mehreren 10 ml Aliquots (Greiner, Nürtingen) bei 4° C und 190 G für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zentrifugat noch zwei weitere Male mit kalter Hank'scher Lösung gewaschen. Um eine Agglutination zu verhindern, wird eine Spatelspitze DNase zugegeben. Danach wird der Ansatz nochmals suspendiert und weiter auf Eis gelagert.

Zur eigentlichen Isolation der Inseln wird das Pankreashomogenat auf mehrere Petrischalen mit 6 cm Durchmesser (Falcon 1007, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, BRD) transferiert und unter nochmaliger Zugabe von 3 bis 5 ml kalter Hank'scher Lösung gleichmäßig verteilt.

Die durch die selektive Rotfärbung im Pankreasgemisch gut identifizierbaren Inseln (Abb. 13) werden unter einem Dissektionsmikroskop (Zeiss, Oberkochen, BRD) oder einem Durchlichtmikroskop (Leitz, Wetzlar, BRD) mittels einer silikonisierten Glaskapillare "herausgepickt" (Abb. 14).

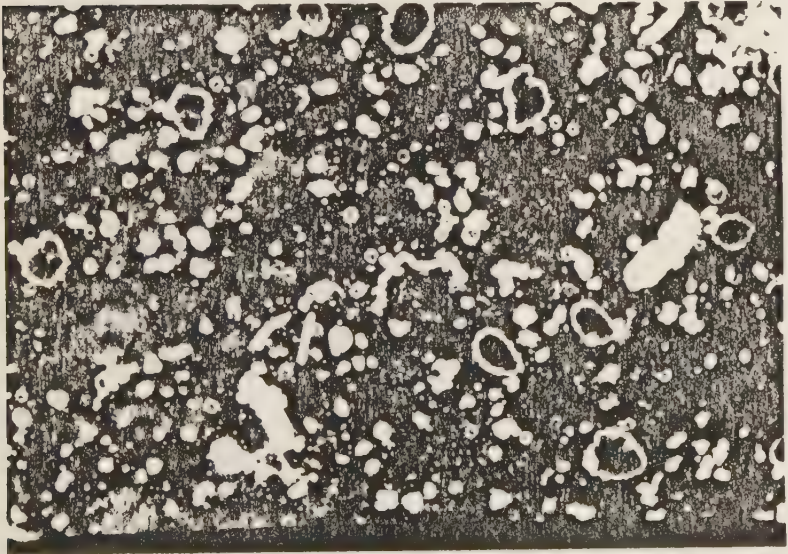


Abb. 13

Um eine möglichst reine Transplantatpräparation zu erreichen wird der Pickvorgang zwei- bis dreimal wiederholt. Nach dem letzten Reinigungsschritt werden 800 bis 1200 hochgereinigte Inseln (siehe 3.1., Abb. 18 und 19) entweder zur Transplantation in eine 2 ml-Spritze gesammelt (siehe Abb. 15) und in 0,5 ml Hank'scher Lösung suspendiert oder für in-vitro-Testungen in Zellkulturmedium (RPMI 1640) transferiert.

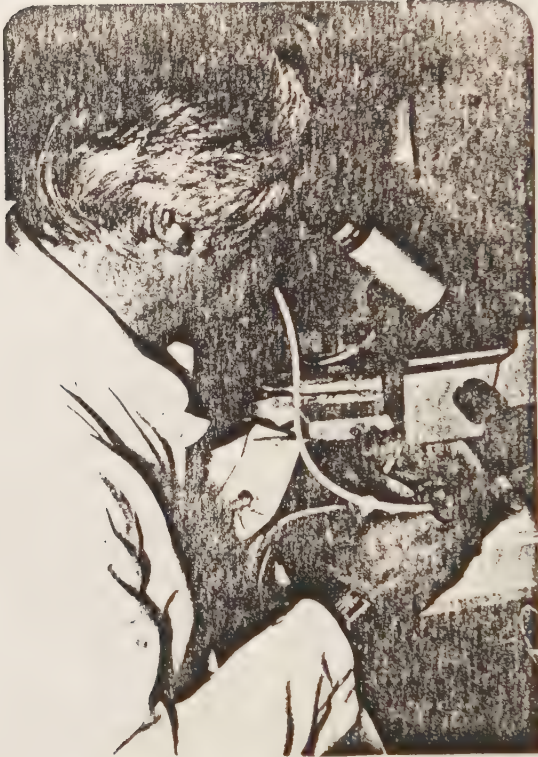


Abb. 14

2.2.4.3. In-vitro-Glukosestimulation

Um zu testen, ob eine intakte Sekretionsfunktion der Inseln nach der oben beschriebenen Isolationsprozedur noch gewährleistet ist, wurde als Qualitätskontrolle ein in-vitro-Glukosestimulations-Test durchgeführt. Dazu wurden 150 "frisch" isolierte Inseln in glukosefreies Kulturmedium (RPMI 1640) eingebracht. Nach dem Retransfer in ein Medium das 25 mmol/l Glukose enthielt, wird der Insulinspiegel im Überstand bestimmt, vom Ausgangspunkt in 5-Minutenabständen bis 35 Minuten, nach 60 und nach 90 Minuten. Die Bestimmungen wurden mit einem Insulin-Radio-Imuno-Assay (RIA) (Amersham und Buchler, Braunschweig, BRD) im Endokrinologischen Labor der Chirurgischen Klinik bei PD Dr. Teichmann durchgeführt.

2.2.4.4. Inseltransplantation

2.2.4.4.1. Technik der Inseltransplantation

Das Abdomen von diabetischen Empfängertieren wird mit einer Inzision in der Mittellinie eröffnet. Nach Links-Lateralisation des Darms, wird die Pfortader dargestellt und zur Injektion präpariert. Die in einer 2ml-Spritze gesammelten Inseln (Abb.15) werden vor Transplantation nochmals aufgeschüttelt um eine Bildung von Aggregaten zu verhindern. Etwa 1,5 cm distal der Leberpforte wird die Vena portae mit einer 27 G-Nadel (5/8, 0,4x16, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, BRD) punktiert. Nach Aspiration von Blut werden etwa 1000 Inseln langsam injiziert (siehe Abb.16).

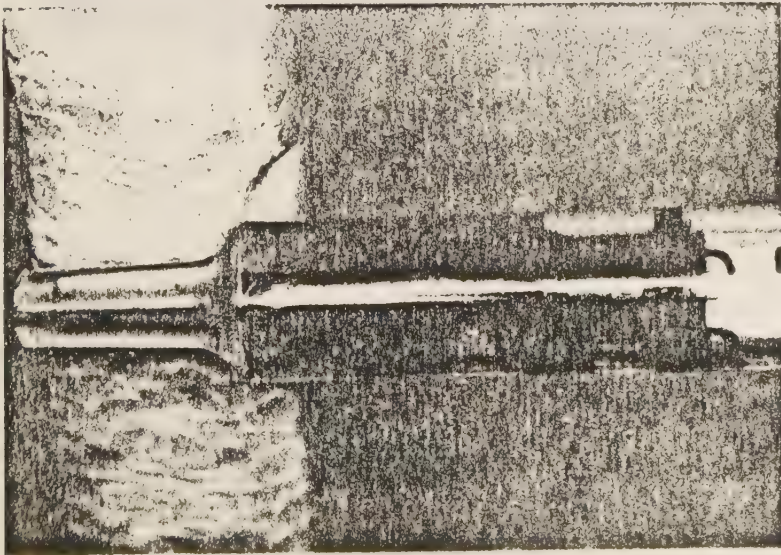


Abb. 15



Abb. 16

Nach Entfernen der Nadel wird die Punktionsstelle zur Blutstillung mit einem Wattestäbchen ganz leicht komprimiert. Mit einer fortlaufenden, durchgreifenden Naht (Vicryl^R 3x0, Ethicon, Norderstedt, BRD) wird das Abdomen verschlossen. Nach Desinfektion der Haut im Nahtbereich (Kodan^R-Spray) wird ein Sprühverband (Nobecutan^R) zum Schutz der Naht aufgetragen. Als antibiotische Prophylaxe wurde für 2 Tage Totocyllin^R (2,5 mg/kg Körpergewicht) intravenös (in die Penisvene) gegeben. Bei bronchialer Hypersekretion wurden postoperativ nochmals 0,1 bis 0,3 mg Atropin-Sulfat injiziert.

2.2.4.4.2. Postoperativer Verlauf - Abstoßung

Zur Bestimmung des postoperativen Verlaufs wurde täglich Gewicht und im Ein-bis Zweitagesabstand Blutzucker bestimmt, ab dem 30. Tag nur noch alle 2 bis 5 Tage. Bei Verdacht auf Abstoßung wurde der Blutzucker wieder täglich gemessen.

Als Kriterium für Abstoßung wurde der Anstieg des Zuckerspiegels über 15 mmol/l bei ansteigender Tendenz mit beginnender Polyurie gewertet.

2.2.4.4.3. Transplantationsgruppen - Pseudoisogenität

Hier muß vorausgeschickt werden, daß die ursprüngliche BB/Wistar-Kolonie nicht konsequent ingezüchtet und deshalb auch nicht streng isogen (53) war (siehe auch 2.2.4.1.2.). Somit können Transplantationen innerhalb der Kolonie durchgeführt, nicht als streng isogen bezeichnet werden. Durch eine konsequentere Inzucht im Laufe der letzten Jahre haben sich bestehende Unterschiede innerhalb der Kolonie jedoch zunehmend reduziert, ja beinahe eliminiert. Naji (108,109) fand bei Untersuchungen innerhalb der Kolonie nahezu isogene Verhältnisse vor. So überleben Hauttransplantate, die bei bestehender Histoinkompatibilität in der Regel am schnellsten abgestoßen werden, innerhalb der Kolonie transplantiert, länger als 100 Tage (vergleiche 142).

Um den besonderen Verhältnissen im BB/Wistar-Modell Rechnung zu tragen, wurde für Transplantationen innerhalb des BB/Wistar-Stammes die Bezeichnung "pseudo-isogen" gewählt.

Entsprechend unserer ersten Fragestellung (siehe 2.1.1.) teilten wir Inseltransplantatempfänger in zwei Hauptgruppen ein:

- a. Kurzzeit - diabetische Empfänger - d.h. stabiler Diabetes bis 20 Tage nach dem "diabetic onset"
- b. Langzeit - diabetische Empfänger - d.h. stabiler Diabetes länger als 12 Wochen nach dem "diabetic onset"

Mit Blick auf die weitere Fragestellung und auf eine mögliche klinische Relevanz sollten neben den "pseudo" - isogenen auch allogene Transplantationen durchgeführt werden.

Hierzu wurde ein starkes Abstoßungsmodell (53) von Lewis auf BB/Wistar gewählt, um den Effekt von immunsuppressiven Therapieansätzen klar determinieren zu können, da zu erwarten ist, daß sich die Transplantationsgruppen deutlich unterscheiden.

Folgende Untergruppen:

- A a "Pseudo"-isogene Transplantation (BB/W auf BB/W) - kurzzeitig - diabetische Empfänger
- A b "Pseudo"-isogene Transplantation - langzeit-diabetische Empfänger
- B a Allogene Transplantation (Lewis auf BB/W) - kurzzeit-diabetische Empfänger
- B b Allogene Transplantation - langzeit-diabetische Empfänger

An den oben zusammengestellten Transplantationsgruppen soll nun die Wirkung und Überlebenszeit von Inseltransplantaten bei den unterschiedlichen Empfängervoraussetzungen verglichen und gleichzeitig der Effekt von zwei immunsuppressiven Regimen untersucht werden.

Die obigen Transplantationsgruppen wurden anhand der Therapie folgendermaßen gruppiert:

- 1) keine Therapie - keine Immunsuppression
- 2) postoperative Immunsuppression mit Cyclosporine (dieser Ansatz ist vergleichbar mit der klinischen Anwendung von Cyclosporine bei anderen Transplantationen)
- 3) prä - und postoperative Immunsuppression mit Cyclosporine

Die so entstehenden 12 Transplantationsgruppen (siehe Abb.17) bilden den Ausgangspunkt für die zu untersuchenden Fragestellungen.

TRANSPLANTATIONSGRUPPEN

	keine Immun-suppression		CsA postoperativ		CsA prä- u. postoperativ		
A	A1a	A1b	A2a	A2b	A3a	A3b	"pseudo"-isogen
B	B1a	B1b	B2a	B2b	B3a	B3b	allogen
	kurz -	lang -	kurz -	lang -	kurz -	lang -	zeit
	diabetische Empfänger						

2.2.4.5. Immunsuppression

Als Immunsuppression wurde Cyclosporine (Sandimun^R) von Sandoz, Basel, Schweiz verwandt, das wie schon erwähnt bei der segmentalen Pankreas- und anderen Transplantationen erfolgreich verwendet wird (siehe 1.3.4.4.3.).

2.2.4.5.1. Dosierung, Aufbereitung und Applikation

Cyclosporine wurde zur postoperativen Therapie in der Dosis 25 mg/kg Körpergewicht am Tag 0,1,3,7 nach Transplantation gegeben.

Bei zusätzlicher praoperativer Gabe wurden 10 mg/kg Körpergewicht am Tag 9,6,3 vor Transplantation injiziert.

Cyclosporine wurde in der Konzentration 10 mg/ml in reinem Olivenöl (kaltgepreßt, Stefanini & Co., Altopascio, Italien) unter Rühren (10 Min./1000 UPM) gelöst. Zur Injektion wurde die Dosis auf zwei Portionen verteilt und in die Muskulatur der Rattenhinterbeine injiziert.

2.2.4.5.2. Cyclosporine-Spiegel

Cyclosporine-Spiegel wurden stichprobenartig bei einigen Empfänger-tieren mit funktionierendem Transplantat 30 und 60 Tagen nach Transplantation bestimmt. Häufigere Bestimmungen konnten nicht durchgeführt werden, weil zur Testung 1 ml Blut notwendig ist. Cyclosporine-Spiegel wurden aus Vollblut mittels eines Radio-Immuno-Assay (Sandoz AG, Basel, Schweiz) im Labor des Transplantationszentrums München (Leiter Prof. W. Land) bestimmt.

2.2.4.6. Histologische Untersuchungen

Zur Klärung der Vorgänge, die beim Diabetes und nach der Transplantation an der Langerhans'schen Insel ablaufen, wurden histologische und immunhistochemische Untersuchungen an folgenden Organen durchgeführt:

- a) Pankreas von **normoglykämischen** BB-Kontrollratten
- b) Pankreas von **subklinisch-diabetischen** BB-Wistar-Ratten
- c) Pankreas von **manifest-diabetischen** BB-Wistar-Ratten
- d) **isolierte Inseln** vor Transplantation (nach Neutral-Rot-Vitalfärbung und Isolation)
- e) Leber von Empfängertieren nach intraportaler Transplantation von Inseln bei **intakter Transplantatfunktion**
- f) Leber von Empfängertieren nach intraportaler Transplantation von Inseln - **beginnender Funktionsverlust** des Transplantats oder klinische Abstoßung des Transplantats

Zu allen histologischen Untersuchungen wurden einzelne Tiere geopfert und Pankreas bzw. Leber im gesamten entfernt. Die Gewebsteile wurden in Formalin (5 %) oder nach Bouin (125) fixiert, danach in Paraffin eingebettet und 5 µm Gewebsschnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden HE gefärbt bzw. mit Anti-Insulinserum beträufelt. Mit Hilfe der indirekten Immun-Peroxydasetechnik (113) können so Insulin-positive Zellen erkannt werden. Alle histologischen Präparate wurden von PD Dr. W. Permanetter, Institut für Pathologie der LMU München, angefertigt und beurteilt.

3. Ergebnisteil

3.1. Inselisolation

Mit der beschriebenen Isolationsmethode konnten 800 - 1200 Langerhans'sche Inseln aus einem Rattenpankreas isoliert werden. Abbildung 18 zeigt eine Insel der Transplantatpräparation nach dreimaligem Pickvorgang in einhundertfacher Durchlichtvergrößerung. Die mit Neutral-rot vital gefärbte Insel zeigt sich fast vollständig frei von umgebendem exokrinen und anderem Gewebe. Im folgenden nach HE-gefärbtem histologischen Präparat läßt sich ebenfalls die vollständige Isolation der Inseln zeigen (siehe Abb.19). Die immunhistochemische Untersuchung einer Insel der Transplantatpräparation bestätigt die morphologische Intaktheit und gleichzeitig qualitativ vollständige Isolation. Abbildung 20 zeigt eine immunhistochemische Färbung auf Insulin, dabei stellen sich im zentralen Bereich der Insel die Insulin-positiven B-Zellen und im peripheren Bereich (siehe Pfeile in Abb. 20) die Region der gegengefärbten A-, D-, und PP-Zellen der Langerhans'schen Inseln dar.

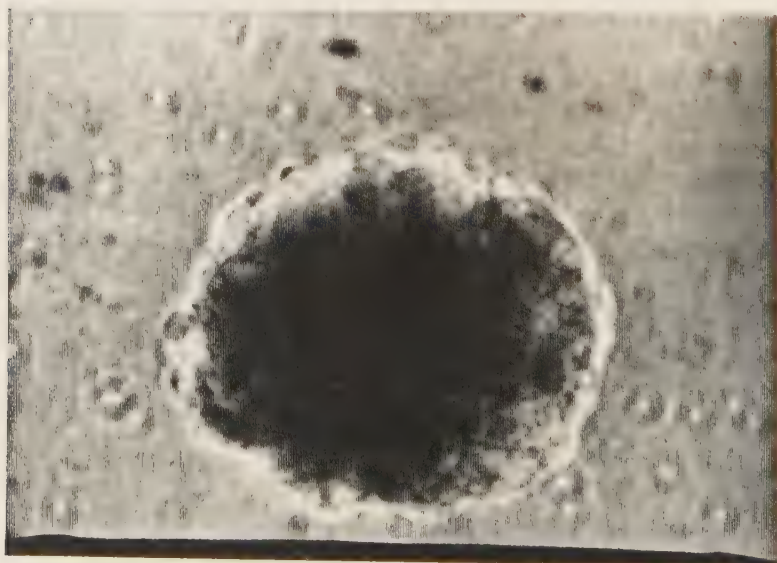


Abb. 18

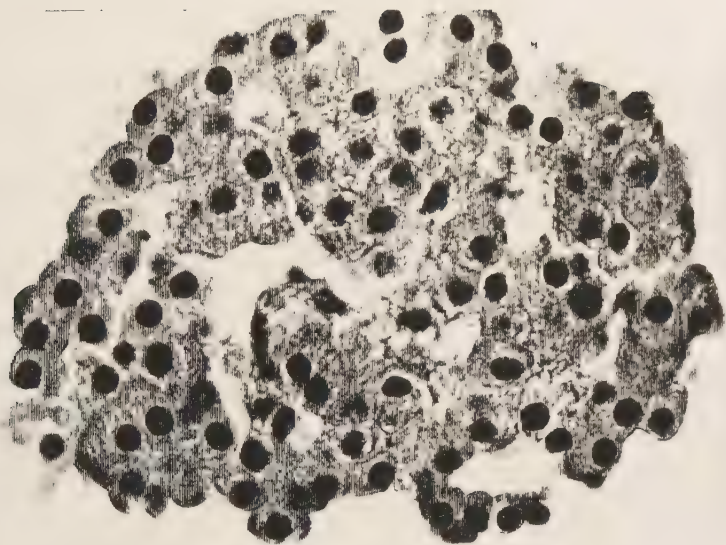


Abb. 19

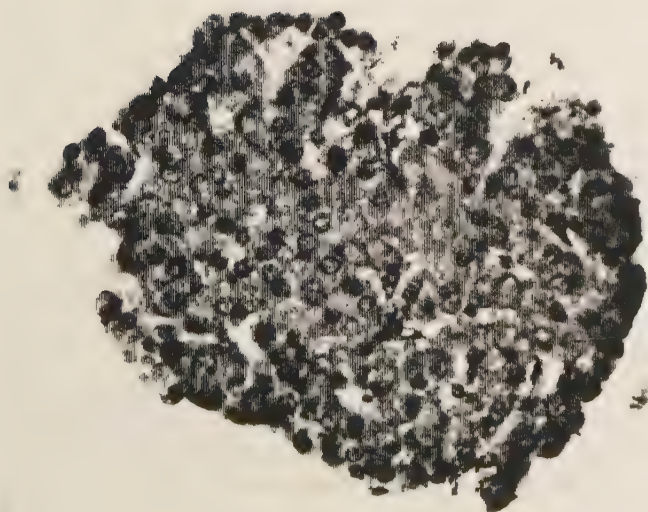
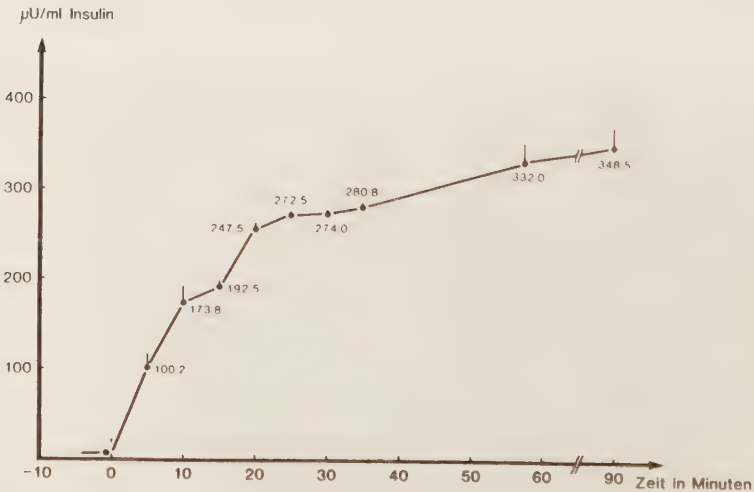


Abb. 20

An Faktoren, welche die Ausbeute bei der Isolation beeinflussen, ergeben sich: Gewicht und Geschlecht des Spenders (Männchen größer und schwerer als Weibchen), Qualität der Perfusion und Präparation des Spenderpankreas sowie die exakte Kontrolle des Verdauungsgrades während der enzymatischen Reaktion.

3.1.1. In-vitro-Glukose-Stimulation

Als funktionelle Vitalitätsprüfung und Qualitätskontrolle der Transplantatpräparation wurde eine in-vitro-Glukose-Stimulation von isolierten Inseln durchgeführt. Abbildung 21 zeigt die Antwort von 150 Inseln auf einen Glukosereiz von 3 g/l. Das Reaktionmuster zeigt eine Stimulierbarkeit und somit die funktionelle Intaktheit der isolierten Inseln an.



i.v. Glukosestimulations-Test

150 Inseln werden nach der Isolation aus glukosefreiem- in Medium mit 450 mg/dl Glukose transferriert.

Proben werden bis 35 Minuten im 5-Minutenabstand entnommen, dann bei 60 Minuten (n=6)

Abb. 21

3.2. Funktionelle Untersuchungen zum Diabetes beim Empfänger vor Transplantation

Anhand von Bestimmungen der Glukosetoleranz und des "insulin-release", die zusätzlich zum bereits erwähnten Diabetes-"Screening"-Programm (2.2.4.1.3.) durchgeführt wurden, konnten für BB/Wistar-Ratten folgende Verlaufsformen des Diabetes charakterisiert werden: Ausgangspunkt war eine Gruppe von Tieren mit zu erwartender hoher Diabetesinzidenz, die am Tag 60 nach Geburt bei fehlenden klinischen Anzeichen einer Stoffwechselstörung bereits eine gestörte Glukosetoleranz (Abb. 22, Kurve e) mit reduziertem "insulin-release" (Abb.23, Kurve b) im Vergleich zu Kontrolltieren aufwies.

Ein Teil dieser Tiere entwickelte in der Folge einen massiv verlaufenden Diabetes (Blutglukose > 20 mmol/l) mit schnell ansteigendem Insulinbedarf und Neigung zur Ketoazidose (Abb.22, Kurve f und Abb. 23, Kurve d).

Eine andere Gruppe von Ratten entwickelt aus dem präklinischen Diabetesstadium eine mildere Verlaufsform mit langsam ansteigender Insulindosis, bei pathologischer Glukosetoleranz (Abb.22, Kurve f), jedoch weniger deutlich reduziertem "insulin-release"(Abb.23, Kurve c). Die Tendenz zur Entwicklung einer Ketoazidose war gering.

Eine dritte Gruppe hingegen verblieb maximal bis zum 140. Tag nach Geburt im grenzwertig diabetischen Stadium (Abb. 22, Kurve e und Abb. 23, Kurve b) und entwickelt dann langsam ansteigenden Insulinbedarf.

3.3. Inseltransplantationsergebnisse (allgemein)

Die intraportale Transplantation von ca. 1000 mittels Neutral-Rot-Methode frisch isolierter Inseln führte bei allen Empfängern zur Normoglykämie ohne weiteren exogenen Insulinbedarf maximal zwei Tage nach Transplantation (siehe Abbildungen 24 etc.). Erfolgreich

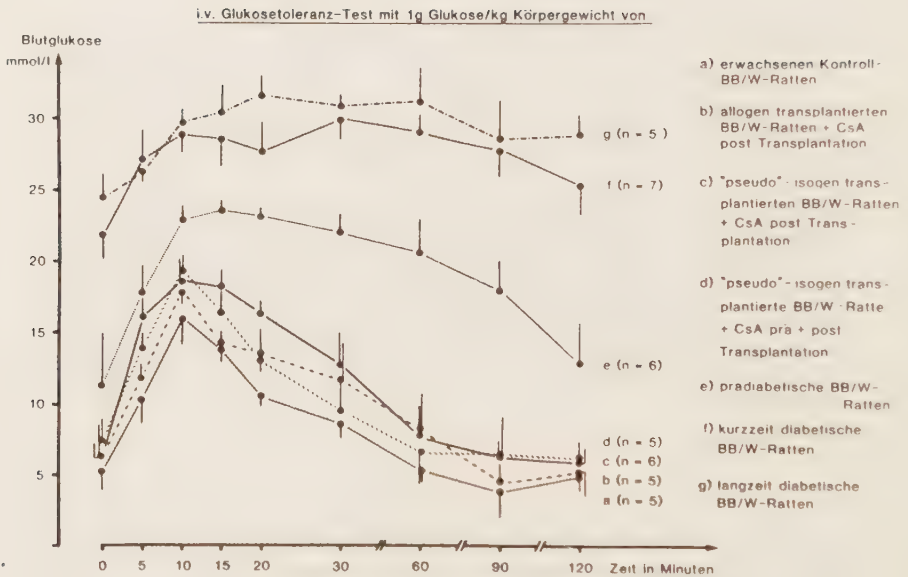


Abb. 22

transplantierte Tiere blieben normoglykämisch bis zum Tage der Abstoßung. Polyurie, Polydipsie und Polyphagie verschwanden postoperativ ebenso wie die Glukosurie. Nach einem postoperativen Intervall von ca. 3 Tagen setzte eine mit gleichaltrigen Kontrolltieren vergleichbare Gewichtsentwicklung ein.

Bei der Abstoßung kehrten die klinischen Parameter des Diabetes wieder. Nach der Abstoßung erreichte keines dieser Tiere ohne Insulintherapie jemals einen normoglykämischen Zustand. Unbehandelte Tiere starben im Mittel 20 Tage nach Abstoßung.

Insulin - Freisetzung während eines i.v. Glukosetoleranz-Test mit 1g Glukose/kg Körpergewicht von

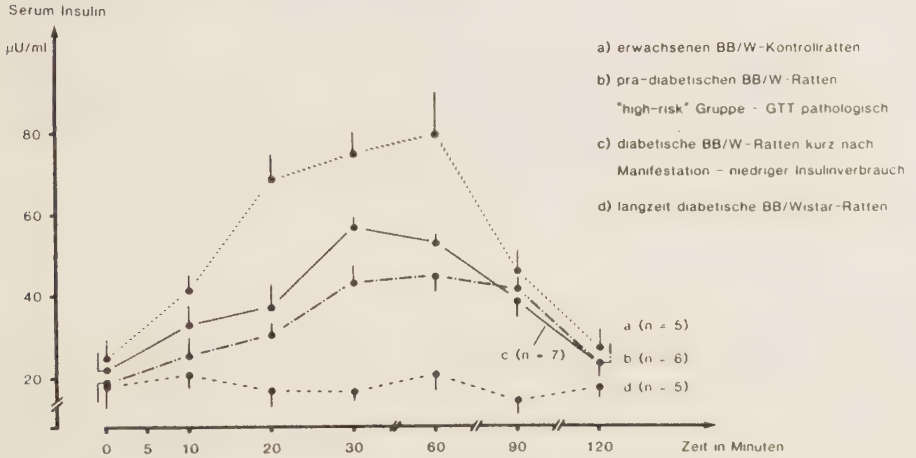


Abb. 23

Operationskomplikationen wie Pfortaderthrombosen oder unstillbare Blutungen aus der Injektionsstelle traten nach sorgfältiger und schonender Kompression der Injektionsstelle bei gleichzeitiger Verwendung extrem dünner Kanülen nicht auf. Bei 125 durchgeführten Transplantationen verstarben lediglich zwei Tiere postoperativ an Pneumonie und zwei Tiere intraoperativ an narkosebedingtem Atemstillstand.

3.3.1. Funktionelle Untersuchungen nach Transplantation

Zum Ausschluß eines latenten Diabetes wurden i.v.- Glukosetoleranz und "insulin-release" für 15 Tage nach Transplantation bestimmt. Aus Abb. 22 und Abb. 24 ergibt sich kein Unterschied zwischen transplantierten Tieren (Gruppe b,c,d) und Kontrolltieren Gruppe a bei der Glukosetoleranz. Vergleichbares gilt für den "insulin-release" (Abb. 24). Die berechneten K-Werte der einzelnen Gruppen bewegten sich im Normbereich. Nach der Abstoßung des Transplantats erreichten Empfängertiere wiederum das Niveau diabetischer unbehandelter Kontrollen.

Insulinfreisetzung während i.v. Glukosetoleranz-Test mit 1g Glukose/kg Körpergewicht von

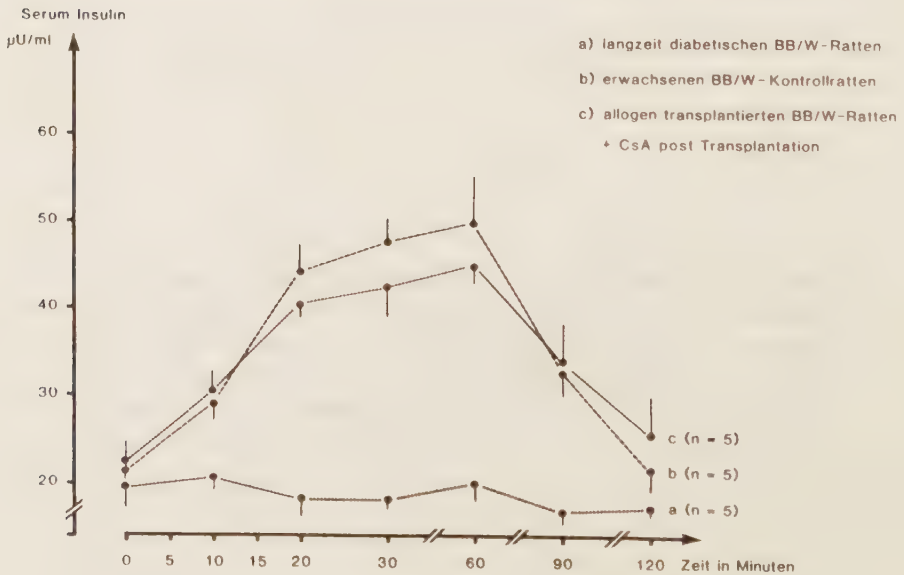


Abb. 24

3.4. Inseltransplantation ohne Immunsuppression

Diese Versuche ohne Immunsuppression bildeten den Ausgangspunkt für den Vergleich der folgenden Therapieansätze. Deren mögliche Wirkung soll anhand des Vergleichs von Inseltransplantatüberlebenszeiten gemessen werden.

"Pseudo"- isogene Inseltransplantation nicht-diabetische BB/W → kurzzeit-diabetische BB/W
ohne Immunsuppression (n = 10)

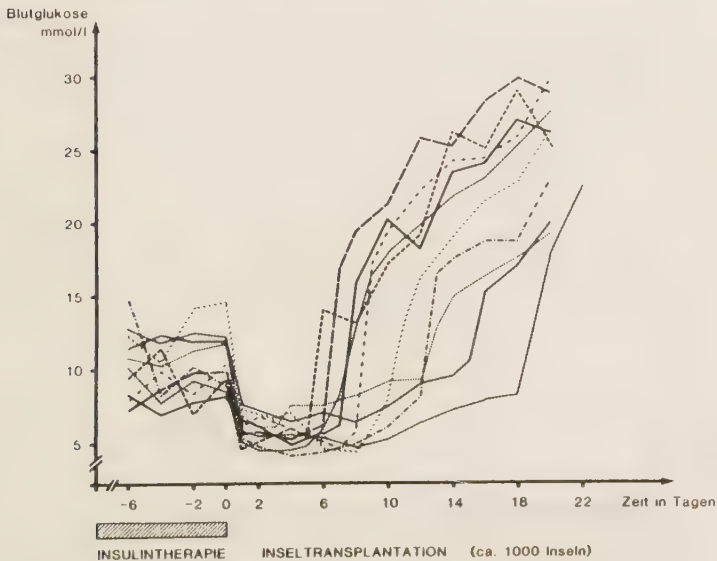


Abb. 25

3.4.1. "Pseudo"-isogene Transplantationsgruppen

Kurzzeit- und langzeitdiabetische BB/Wistar-Empfänger erhielten 1000 BB-Inseln. Die folgenden Diagramme zeigen die Individualverläufe prä- und postoperativer Blutzuckerspiegel transplantierter Tiere (Abb. 25 und Abb. 26). Bei kurzzeitig diabetischen Empfängern lag die Inselüberlebenszeit im Bereich von 5 bis 18 Tagen (Abb. 25 und Abb. 29), bei langzeitdiabetischen Empfängern zwischen 15 und 38 Tagen (Abb. 26 und Abb. 29). In dieser Gruppe tolerieren langzeitdiabetische Empfänger Inseln mit durchschnittlich 28 ± 8 Tagen signifikant länger ($p < 0,0001$, siehe Abb. 61) als kurzzeitdiabetische Empfänger mit $10 \pm 4,2$ Tagen (siehe Abb. 29).

"Pseudo"- isogene Inseltransplantation nicht-diabetischer BB/W → langzeit diabetische BB/W ohne Immunsuppression
(n = 10)

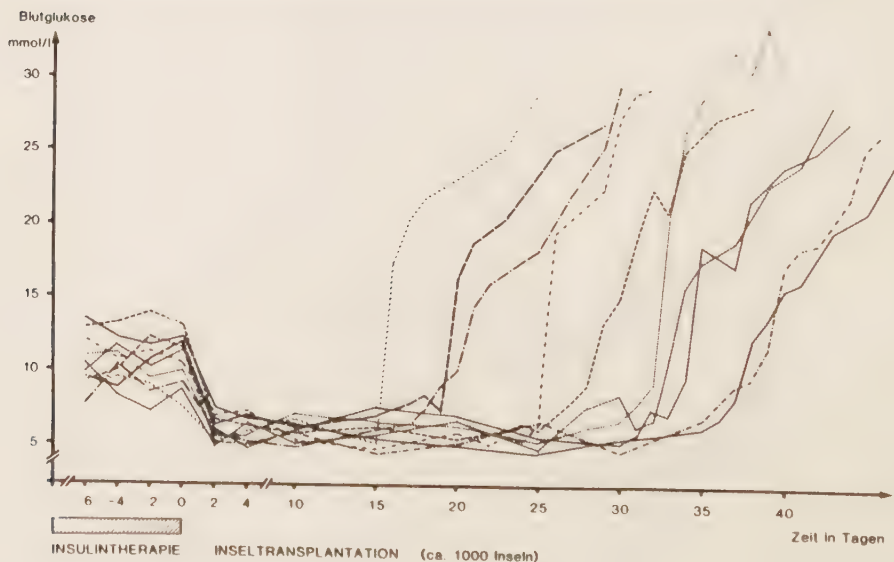


Abb. 26

3.4.2. Allogene Transplantationsgruppen

Als allogene Transplantation über eine starke Histoinkompatibilität (engl.: Major Histocompatibility-Complex = MHC) erhielten kurz- und langzeitdiabetische BB/Wistar-Empfänger Lewis-Inseln. Diese Inseln überlebten bei kurzzeitdiabetischen Empfängern 2 bis 7 Tage (Abb. 27 und 29) und bei langzeitdiabetischen 3 bis 9 Tage (Abb. 28 und 29). Auch hier besteht zwischen langzeitdiabetischen ($6 \pm 2,4$ Tage) und kurzzeitdiabetischen Empfängern ($4 \pm 1,5$ Tage) gerade noch ein signifikanter Unterschied ($P=0,035$, vergleiche Abb. 61 und 29).

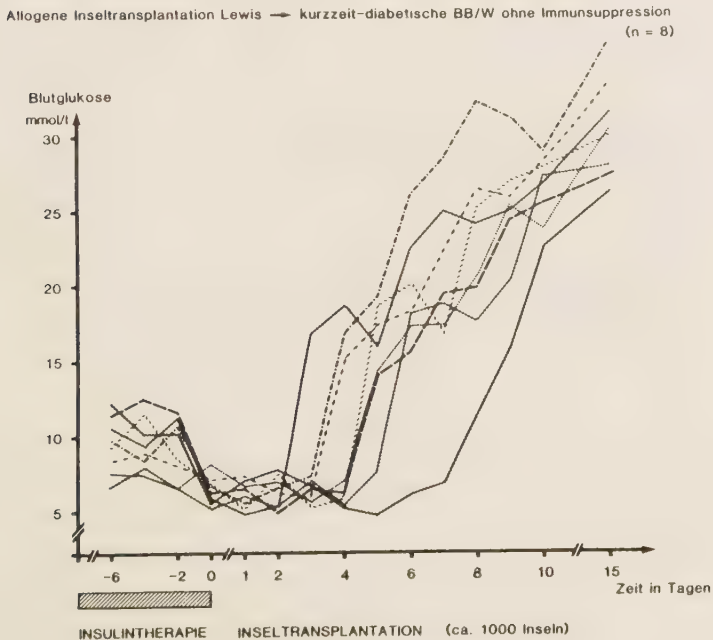


Abb. 27

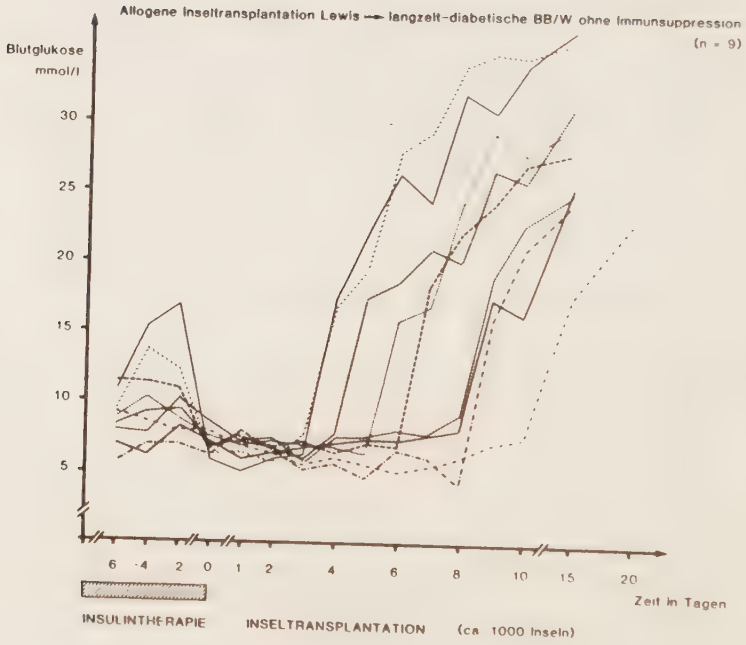


Abb. 28

INSELTRANSPLANTAT - ÜBERLEBENSZEITEN

I TRANSPLANTATION OHNE IMMUNSUPPRESSION		n	Transplantat - Überlebenszeit (Tage)	mittlere Transplantat - Überlebenszeit (Tage)
<u>"pseudo"- isogen:</u>				
n.diab. BB/W → diab. BB/W	a) kurzzeit	10	5, 6, 7, 7, 8, 10, 12, 12, 15, 18	10 ± 4,2
	b) langzeit	10	15, 19, 20, 25, 28, 32, 32, 34, 37, 38	28 ± 8
<u>allogen:</u>				
Lewis → diab BB/W	a) kurzzeit	8	2, 3, 3, 4, 4, 4, 5, 7	4 ± 1,5
	b) langzeit	9	3, 3, 4, 5, 6, 8, 8, 8, 9	6 ± 2,4

Abb. 29

3.5. Inseltransplantation mit postoperativer Cyclosporine-Therapie

Zur postoperativen Therapie wurde Cyclosporine 25 mg/kg Körpergewicht am Tag 0,1,3,7 nach Transplantation i.m. injiziert. Dieses immunsuppressive Schema wurde in Anlehnung an Versuche im Streptozotozinmodell bzw. der momentan praktizierten Immunsuppression bei der klinischen Pankreastransplantation gewählt (25,26).

3.5.1. "Pseudo"-isogene Transplantationsgruppen

Unter postoperativer Cyclosporine-Therapie überlebten "pseudo"-isogen transplantierte Inseln bei kurzzeitdiabetischen Empfängern 17 bis 26 Tage und bei langzeitdiabetischen Empfängern 35 bis 101 Tage (Abb. 30 und 31).

"Pseudo"- isogene Inseltransplantation nicht-diabetische BB/W → kurzzeit-diabetische BB/W mit Immunsuppression (n = 8)

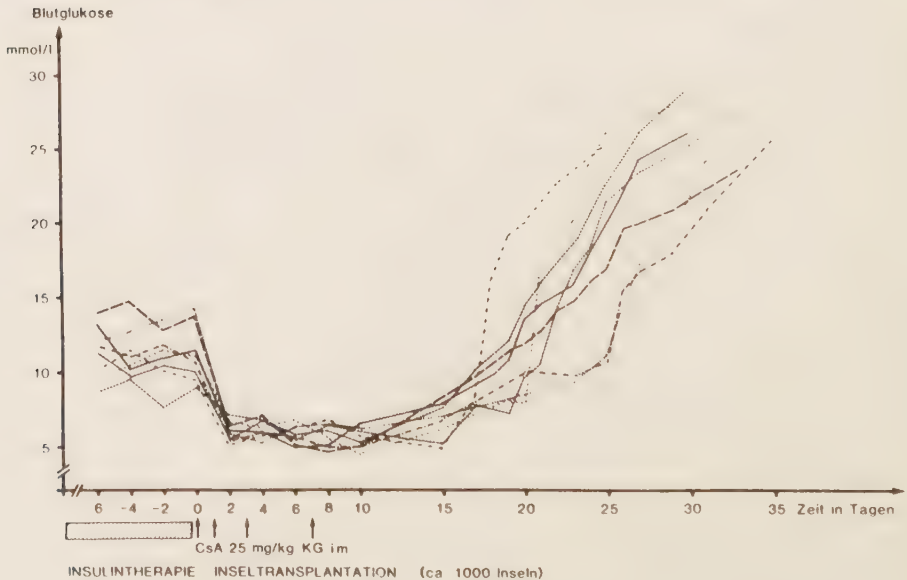


Abb. 30

Langzeitdiabetische Empfänger mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von $70,2 \pm 20$ Tage unterscheiden sich wiederum signifikant ($P < 0,0001$, siehe Abb. 34 und 61) und deutlich von kurzzeitdiabetischen Empfängern mit einer mittleren Überlebenszeit von $22 \pm 3,4$ Tagen. Die postoperative Cyclosporine-Therapie führte bei langzeitdiabetischen Empfängern zu einer Verlängerung der durchschnittlichen Überlebenszeit um etwa 42 Tage. Bei den kurzzeitdiabetischen Empfängern hingegen ließ sich durch Cyclosporine-Gabe nur eine Verlängerung von 12 Tagen erzielen.

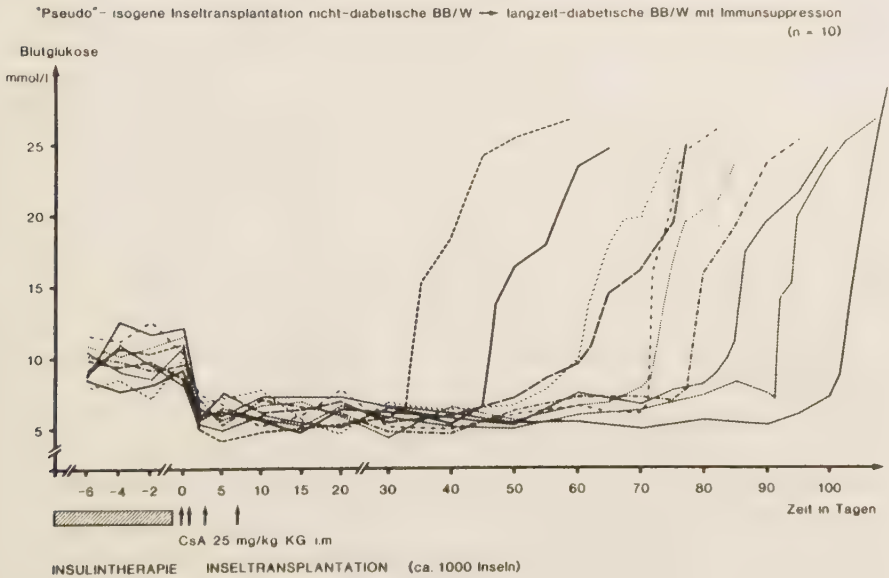


Abb. 31

3.5.2. Allogene Transplantationsgruppen

Bei den allogenen Transplantationsgruppen ließ sich durch postoperative Cyclosporine-Therapie eine deutliche Verlängerung der Transplantat-überlebenszeit erzielen. Bei kurzzeitig diabetischen Empfängern überlebten Inseln zwischen 48 und 72 Tagen (vergl. Abb. 32), bei langzeitdiabetischen Empfängern zwischen 68 und 94 Tagen (siehe Abb. 33).

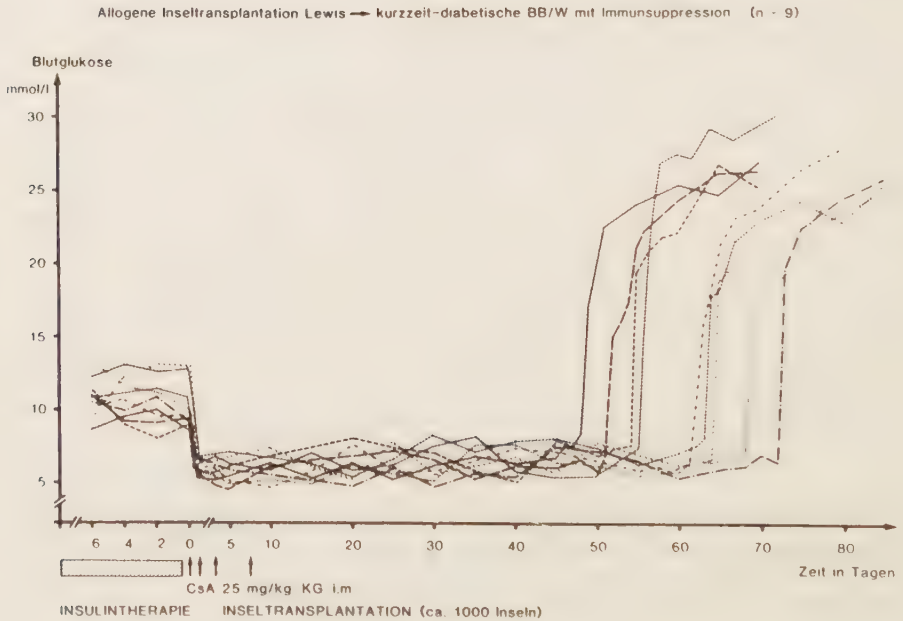


Abb. 32

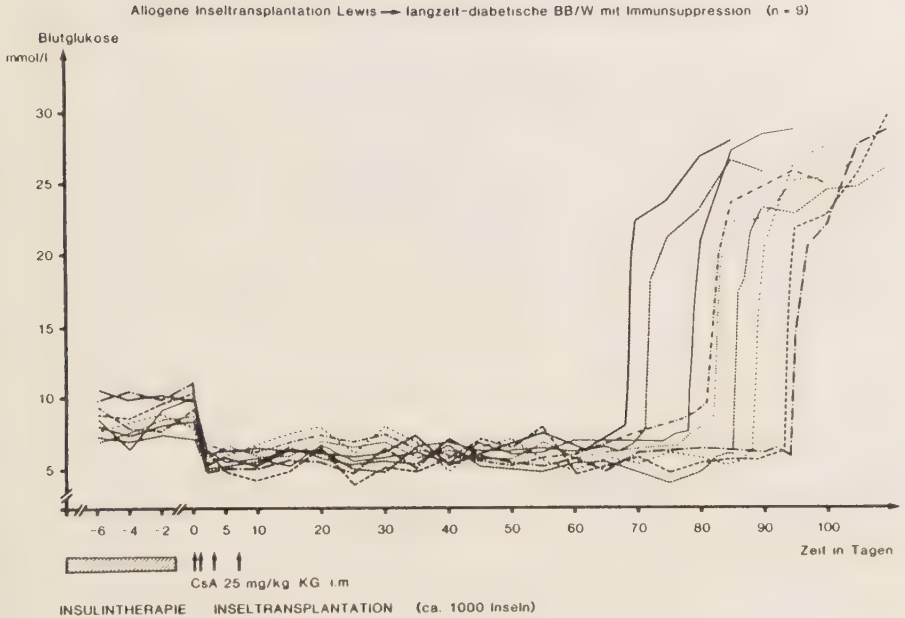


Abb. 33

Der nur geringe Unterschied zwischen kurz- und langzeitdiabetischen Empfängern bei Transplantation ohne Immunsuppression verstärkte sich bei den allogenen Transplantationsgruppen nach postoperativer Cyclosporine-Therapie. Bei langzeitdiabetischen Empfängern überlebten die Inseltransplantate mit $82,2 \pm 9$ Tagen um etwa 23 Tage länger als bei kurzzeitig diabetischen Empfängern mit 59 ± 8 Tagen. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($P < 0,0001$, siehe Abb. 61 und 34). Insgesamt gesehen führt die postoperative Cyclosporine-Therapie bei den allogenen Gruppen zu einer Verlängerung der Inselüberlebenszeiten um 55 bzw. 76 Tage. In beiden allogenen Gruppen werden längere Überlebenszeiten erreicht als in den korrespondierenden "pseudo"-isogenen Gruppen.

INSELTRANSPLANTAT - ÜBERLEBENSZEITEN

II TRANSPLANTATION MIT CsA POST TRANSPLANTATION	n	Transplantat- Überlebenszeit (Tage)	mittlere Transplantat- Überlebenszeit (Tage)
<u>"pseudo"- isogen:</u> n,diab. BB/W → diab. BB/W			
a) kurzzeit	8	17, 19, 21, 21, 22, 25, 26, 26	22 ± 3,4
b) langzeit	10	35, 45, 61, 62, 71, 72, 77, 85, 92, 101	70,2 ± 20
<u>allogen:</u> Lewis → diab.BB/W			
a) kurzzeit	9	48, 51, 54, 55, 61, 63, 64, 68, 72	59 ± 8
b) langzeit	9	68, 71, 78, 81, 82, 85, 88, 93, 94	82,2 ± 9

Abb. 34

3.6. Inseltransplantation mit prä- und postoperativer Cyclosporine-Therapie

Zusätzlich zur postoperativen Cyclosporine-Gabe (siehe 3.5.) wurde Cyclosporine präoperativ 10 mg/kg Körpergewicht am Tag 9,6,3 vor Transplantation intramuskulär verabreicht. Diese vergleichsweise niedere Dosierung wurde in Anlehnung an das klinische Therapiekonzept der Immunsuppression im "diabetic onset" (80,86,99,141 siehe auch 1.3.2.) gewählt.

3.6.1. "Pseudo"-isogene Transplantationsgruppen

Die zusätzliche Immunsuppression vor Transplantation führte bei beiden "pseudo"-isogenen Transplantationsgruppen gleichermaßen nochmals zu einer signifikanten Steigerung des Transplantatüberlebens (siehe Abb. 39 und 61). Besonders deutlich war dies bei der Gruppe der kurzzeit-diabetischen Empfänger; hier lag der Bereich der Überlebenszeit zwischen 48 und 89 Tagen (Abb.35), bei den langzeitdiabetischen zwischen 69 und 124 Tagen (Abb. 36.)

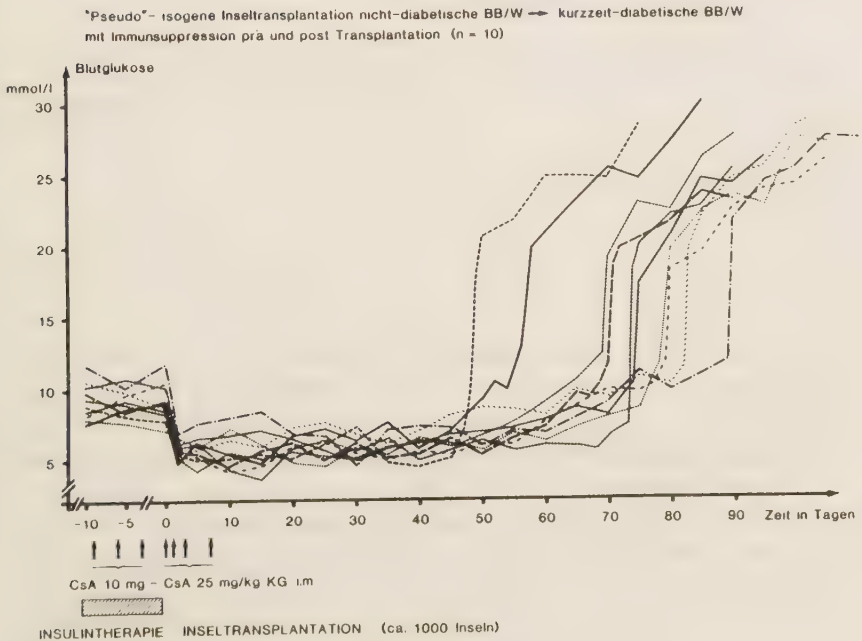


Abb. 35

"Pseudo"- isogene Inseltransplantation nicht-diabetische BB/W → langzeit-diabetische BB/W
mit Immunsuppression prä und post Transplantation (n = 9)

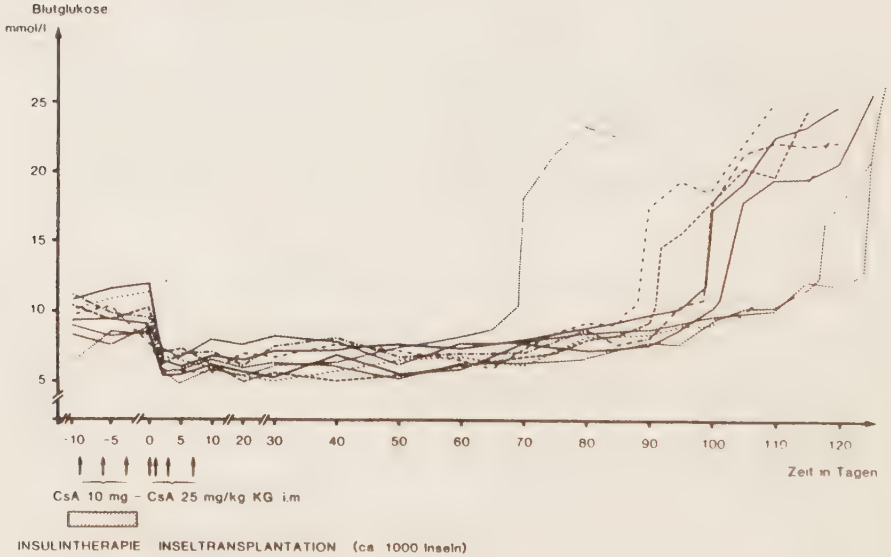


Abb. 36

Wiederum lagen die langzeitdiabetischen Empfänger mit einer mittleren Überlebenszeit von $99,4 \pm 16,3$ Tagen signifikant ($P < 0,001$, siehe Abb. 61 und 39) höher als die kurzzeitdiabetischen Empfänger mit $71,6 \pm 12,1$ Tagen. Bei der letzteren Gruppe jedoch war der Therapieeffekt mit einer Steigerung um etwa 49 Tage ein weitaus deutlicherer gegenüber 29 Tagen bei den langzeitdiabetischen Empfängern. In beiden Gruppen war die Steigerung jedoch signifikant ($P < 0,0001$ /siehe Abb. 61 und 62).

3.6.2. Allogene Transplantationsgruppen

Die allogenen Transplantationsgruppen zeigten ebenso wie die "pseudo"-isogenen weiteren Anstieg der Inseltransplantatüberlebenszeiten bei prä- und postoperativer Immunsuppression mit Cyclosporine. Bei kurzzeit-diabetischen Empfängern lagen die Transplantatüberlebenszeiten zwischen 63 und 93 Tagen (siehe Abb. 37) und bei den langzeitdiabetischen Empfängern zwischen 88 und 128 Tagen (siehe Abb. 38).

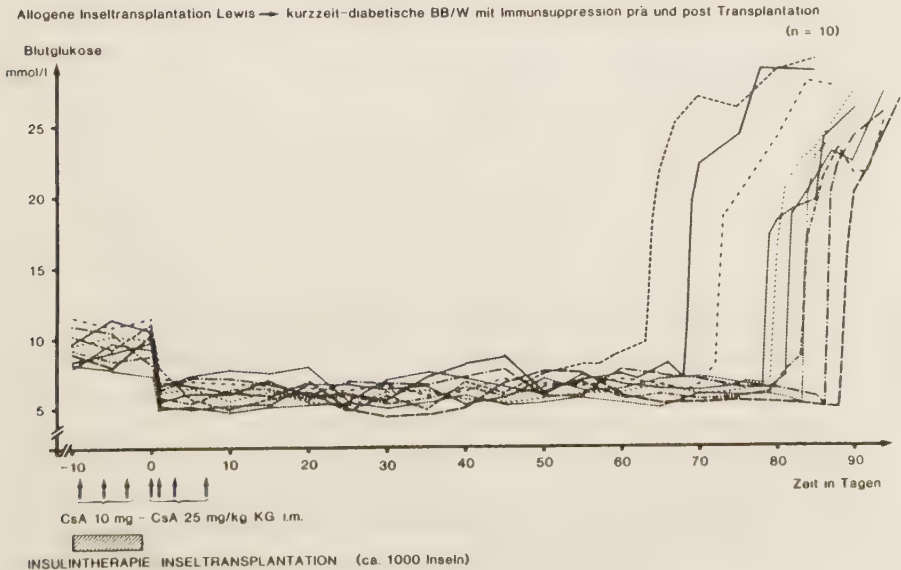


Abb. 37

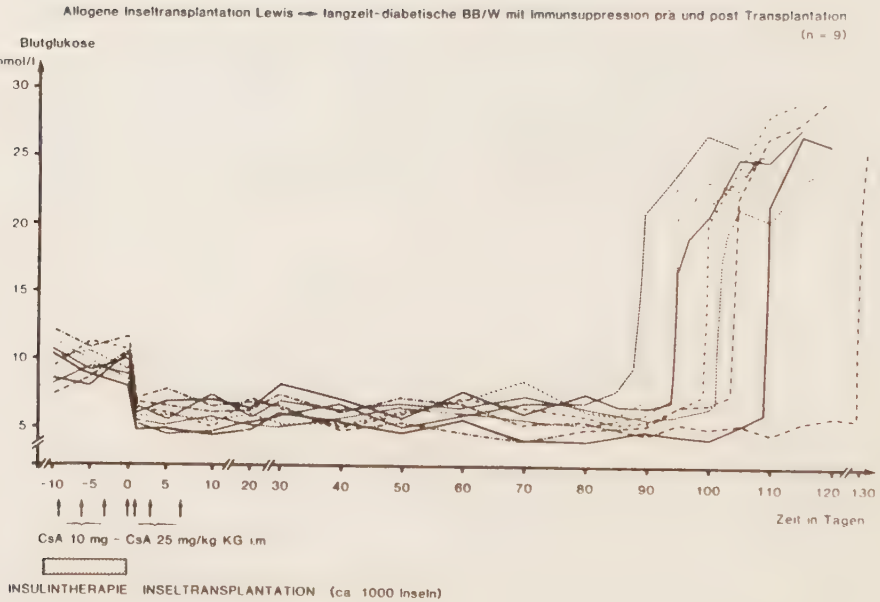


Abb. 38

Wie in allen vorhergenannten Gruppen war der Unterschied zwischen kurzzeitdiabetischen Empfängern mit einer mittleren Transplantatüberlebenszeit von $79,1 \pm 8,1$ Tagen und langzeitdiabetischen Empfängern mit einer mittleren Überlebenszeit von $100,6 \pm 12,3$ Tagen wiederum signifikant ($P < 0,001$ /siehe Abb. 61 und 39). Gegenüber der alleinigen postoperativen Cyclosporine-Therapie wird die mittlere Überlebenszeit bei kurzzeitdiabetischen Empfängern um 20 Tage, bei den langzeitdiabetischen Empfängern um 18 Tage und somit in beiden Fällen signifikant (Abb. 62) gesteigert.

INSELTRANSPLANTAT - ÜBERLEBENSZEITEN

III TRANSPLANTATION MIT CsA PRÄ UND POST TRANSPLANTATION		n	Transplantat- Überlebenszeit (Tage)	mittlere Transplantat- Überlebenszeit (Tage)
<u>"pseudo"- isogen</u> n diab. BB/W → diab. BB/W				
	a) kurzzeit	10	48, 56, 69, 70, 73, 74, 78, 79, 82, 89	71,6 ± 12,1
	b) langzeit	9	69, 88, 91, 98, 98, 101, 109, 117, 124	99,4 ± 16,3
<u>allogen:</u> Lewis → diab. BB/W				
	a) kurzzeit	10	63, 68, 72, 78, 79, 81, 83, 86, 88, 93	79,1 ± 8,1
	b) langzeit	9	88, 89, 94, 94, 99, 101, 103, 109, 128	100,6 ± 12,3

Abb. 39

3.7. Cyclosporine-Spiegel

Cyclosporine-Spiegel wurden stichprobenartig bei transplantierten Empfängern bestimmt, weil eine großangelegte Kontrolle wegen der zur Bestimmung notwendigen Blutmenge von 1 ml nicht möglich war. Bei einigen Tieren wurden Cyclosporine-Spiegel um den 15. postoperativen Tag bestimmt und lagen im Bereich von 500 ng. Im weiteren postoperativen Verlauf konnten bis zum 70. postoperativen Tag bei Stichproben noch Cyclosporine-Spiegel im 100-ng-Bereich nachgewiesen werden. Auch nach präoperativer Cyclosporine-Therapie mit 10 mg/kg Körpergewicht lagen bei einigen Tieren bestimmte Cyclosporine-Spiegel im 100 bis 200-ng-Bereich.

3.8. Histologische Untersuchungen

Histologische Untersuchungen wurden an einigen diabetischen Tieren vor Transplantation und an ausgewählten Inseltransplantierten Tieren durchgeführt. Da für eine histologische Untersuchung eines Empfänger-tieres dieses geopfert werden muß, andererseits aber ebenso der klinische Verlauf nach Inseltransplantationen bestimmt werden sollte, wurden nur exemplarische Untersuchungen durchgeführt.

3.8.1. Histologische Dokumentation des Diabetes der BB/Wistar-Ratte

Hierfür wurden Tiere aus einer Gruppe mit potentiell hoher Diabetesinzidenz gesondert beobachtet und bei geringsten Anzeichen einer pathologischen Glukosetoleranz oder anderen klinischen Symptomen eines Diabetes mellitus fortlaufend histologisch kontrolliert. Die beiden folgenden Abbildungen zeigen völlig intakte Langerhans'sche Inseln normoglykämischer Kontrolltiere, einmal in der HE-Färbung (Abb. 40) und zum anderen in der immunhistochemischen Färbung auf Insulin (Abb. 41). Auf der HE-Färbung läßt sich eine völlig intakte Insel ohne Anzeichen einer lymphozytären Infiltration im Binnenbereich der Insel erkennen. Die Insel ist normalgroß. Die immunhistochemische Färbung auf Insulin identifiziert die B-Zellen, die vorwiegend im zentralen Bereich der Insel zu finden sind. Im Bereich des hier nicht angefärbten Randsaums der Insel sind überwiegend die anderen Zellen des Pankreas (A-, D-, PP-Zellen) zu finden.

Die folgende immunhistochemische Färbung eines Präparates auf Glukagon zeigt nun die Lage von Glukagon-positiven Zellen im Randbereich einer intakten Langerhans'schen Insel.

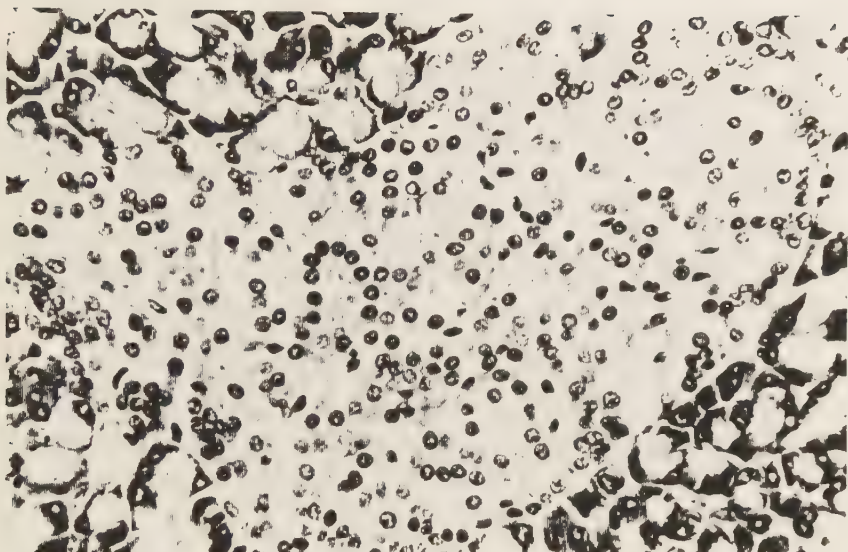


Abb. 40

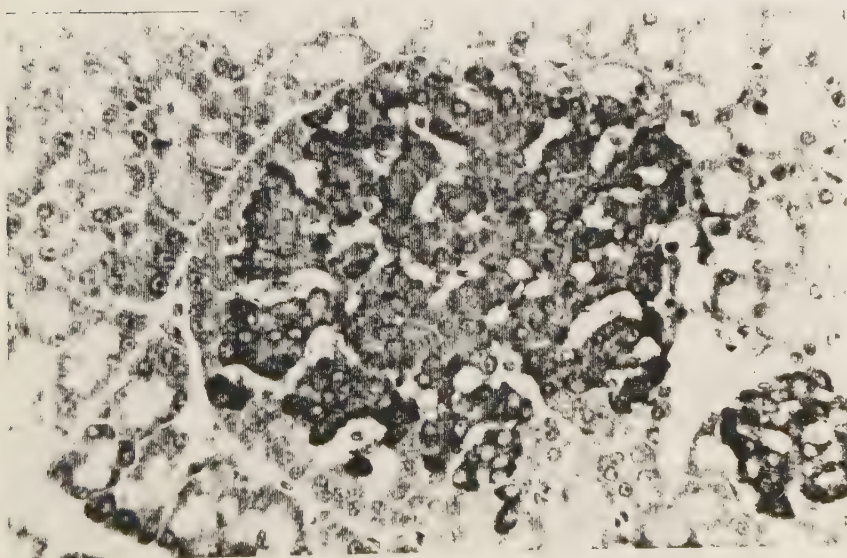


Abb. 41

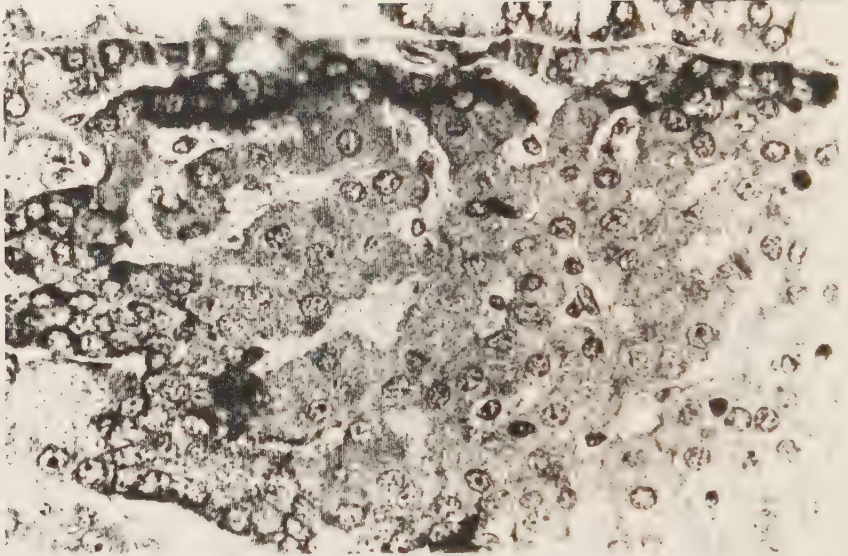


Abb. 42

Eine weitere immunhistochemische Färbung identifiziert in der folgenden Abbildung Nr. 43 die PP-Zellen einer intakten Langerhans'schen Insel. Auch diese sind vorwiegend im Randbereich zu finden.

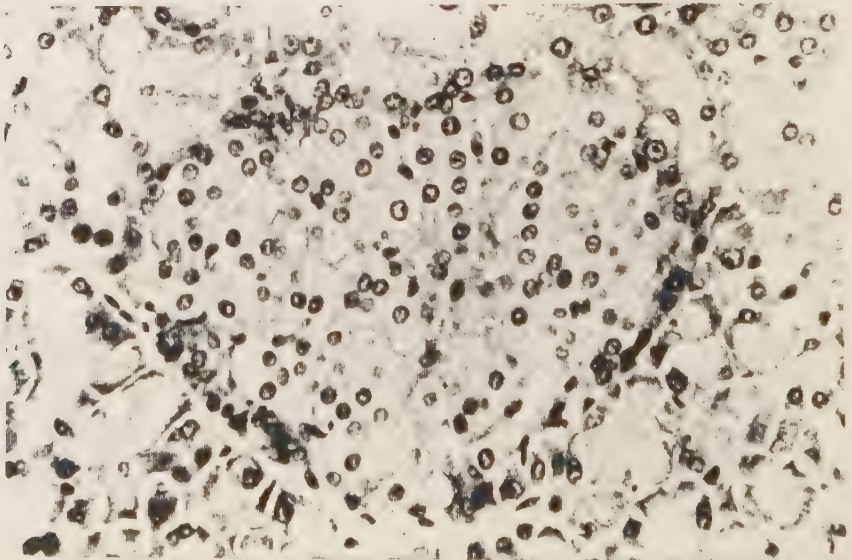


Abb. 43

Untersucht man nun BB/Ratten einer Gruppe mit zu erwartender hoher Diabetesinzidenz ohne oder mit nur subklinischen Anzeichen eines beginnenden Diabetes im Zeitraum zwischen dem 50. und 70. Lebensstag, so läßt sich als histopathologischer Ausdruck der an der Langerhans'schen Insel ablaufenden immunologischen Prozesse eine sogenannte "Insulitis" darstellen. Die beiden folgenden Abbildungen zeigen HE-gefärbte Präparate des Pankreas einer BB-Ratte 55 Tage nach Geburt ohne klinische Anzeichen eines Diabetes mellitus. Bereits im Übersichtsbild (Abb. 44) ist eine deutliche lympho-monozytare Infiltration im Bereich der Langerhans'schen Insel erkennbar, die sowohl die Peripherie wie den Binnenbereich erfaßt. Abbildung 45 verdeutlicht dies in einer hundertfachen Vergrößerung. Eine dichte Infiltration ist erkennbar und die ursprüngliche Binnenstruktur der Insel ist aufgelöst.

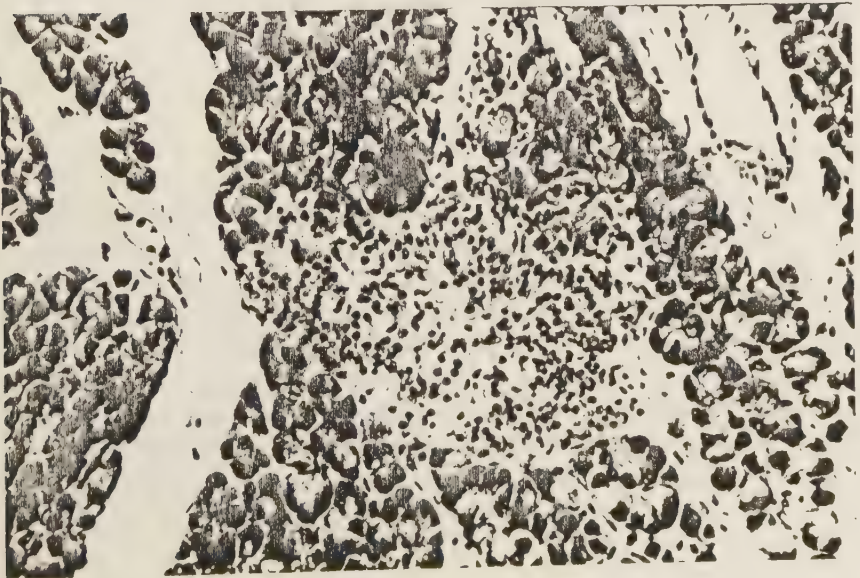


Abb. 44

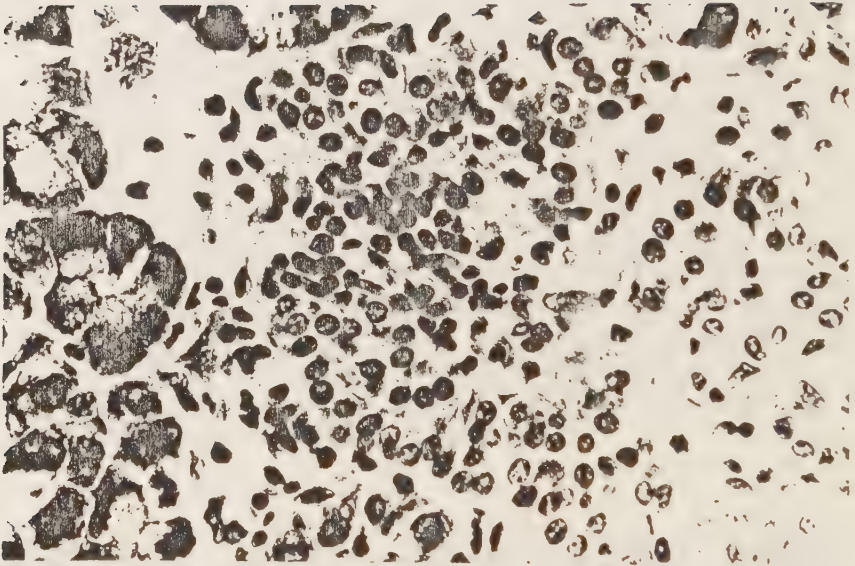


Abb. 45

Die beiden nun folgenden Abbildungen verdeutlichen in einer immunhistochemischen Färbung auf Insulin die Bedeutung des Infiltrates für die Funktion und Präsenz der B-Zellen einer Langerhans'schen Insel. In der Abbildung 46 ist die Einwanderung von Infiltratzellen in den Binnenbereich der Insel gut erkennbar. Das ursprünglich homogene Areal insulin-positiver B-Zellen ist deutlich reduziert, das Infiltrat scheint den B-Zellenbereich förmlich anzunagen. Beim gezeigten Präparat handelt es sich um dasselbe Tier wie in Abbildung 45.

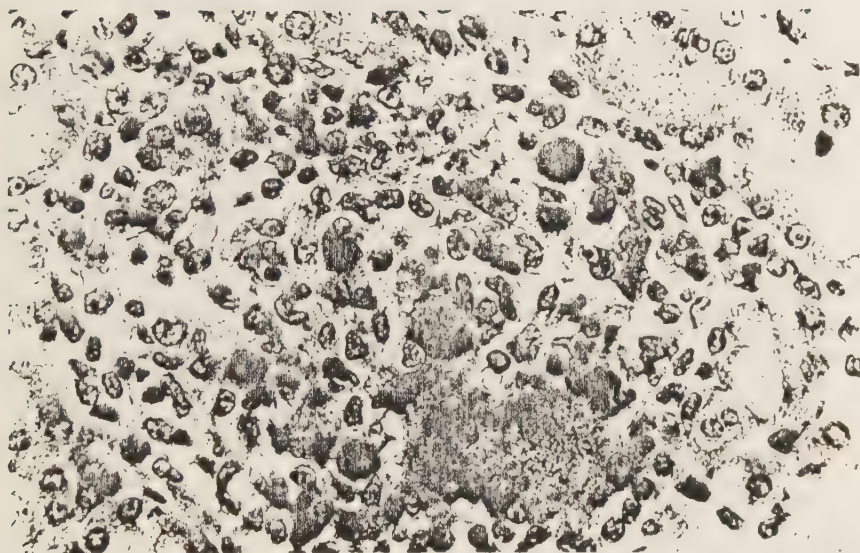


Abb. 46

Abbildung 47 zeigt ein noch weiter fortgeschrittenes Stadium der "Insulitis" eines anderen Tieres 75 Tage nach Geburt mit bereits pathologischer Glukosetoleranz. Das Infiltrat hat noch weiter zugenommen, die B-Zellen sind fast vollständig eliminiert.

Das Endstadium des hier dargestellten Prozesses an der Langerhansschen Insel läßt sich an der in Abbildung 48 dargestellten Insel einer BB-Ratte 94 Tage nach Geburt mit manifestem Diabetes mellitus und einem täglichen Insulinbedarf von 14,4 I.U. Depot Insulin erkennen. Die HE-Färbung des Präparates zeigt eine deutlich verkleinerte umstrukturierte Insel ohne nennenswerte Umgebungsreaktion. Das lymphomonozytäre Infiltrat ist offenbar wieder verschwunden.

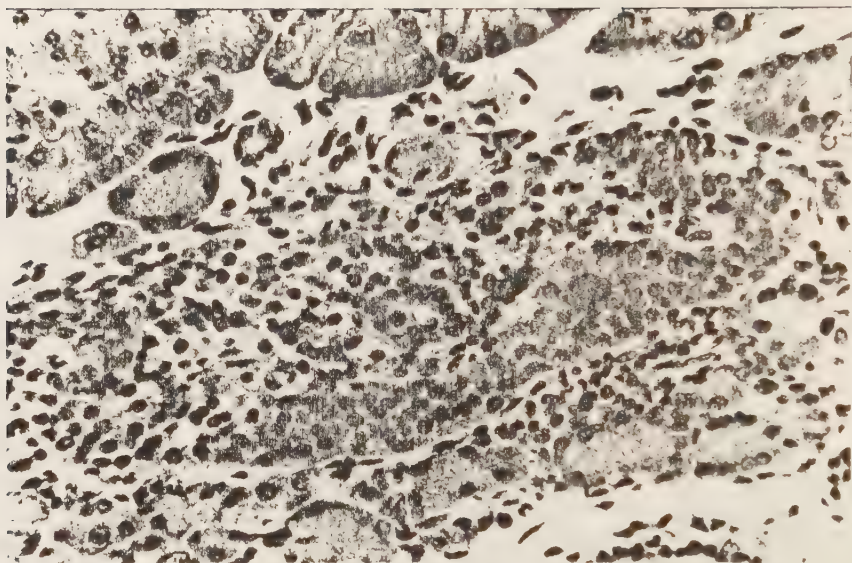


Abb. 47

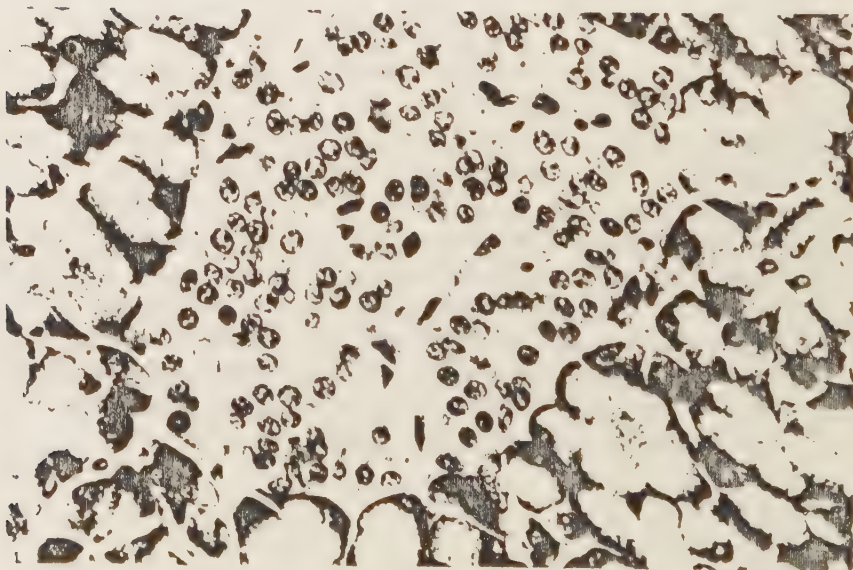


Abb. 48

Immunhistochemisch lassen sich keinerlei insulinpositive Zellen mehr im Bereich der Insel nachweisen. Dies ist erkennbar in Abbildung 49.

Die Gegenfärbung auf Glukagon-positive Zellen zeigt, daß im Bereich der Langerhans'schen Insel nach abgelaufener " Insulitis" in erster Linie Glukagon-positive A-Zellen verbleiben.

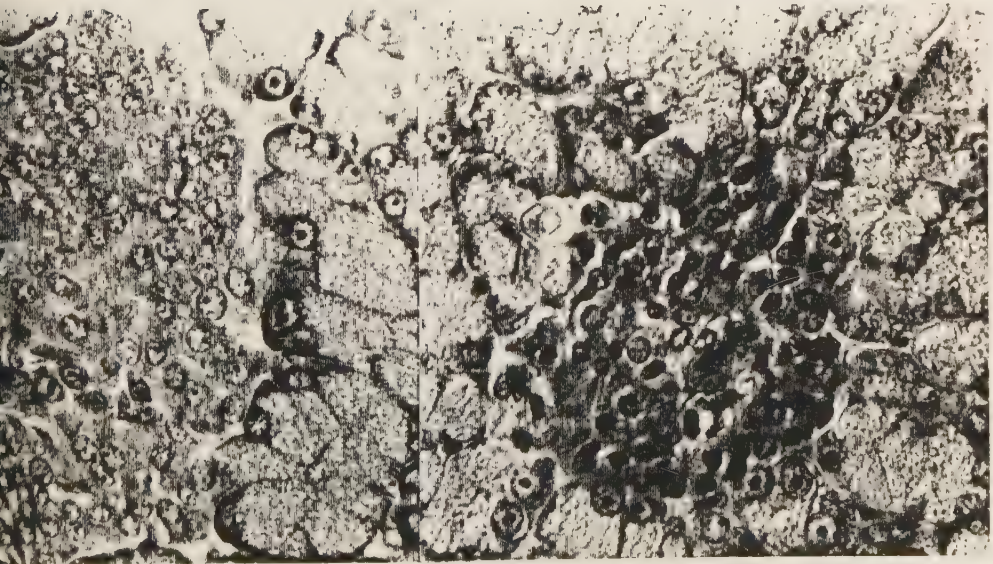


Abb. 49

Abb. 49a

3.8.2. Histologische Untersuchungen an iseltransplantierten Empfängern

Wie o.g., wurden hier einzelne Tiere geopfert und deren Leber histologisch aufgearbeitet. Die Präparate wurden in Formalin (5%) oder nach Bouin (125) fixiert und mit Hämalaun-Eosin (HE) gefärbt oder immunhistochemisch bearbeitet. An vielen Stellen der untersuchten Lebern konnten insulin-positive, embolisierte Inseln bei allen transplantierten Tieren gefunden werden. Abhängig vom Zeitraum nach Transplantation waren diese entweder in kleinen Pfortaderästchen embolisiert, bereits im Verbund organisiert oder sogar mit einer neuen Intima bedeckt (25,26).

Zur Untersuchung kamen sowohl normoglykämische als auch Tiere mit beginnender Abstoßung.

In Abbildung 50 kommt eine Insel 5 Tage nach allogener Transplantation in einem Pfortaderast zur Darstellung. Das Präparat ist nach Bouin (125) fixiert und HE-gefärbt. Der Empfänger wurde mit Cyclosporine immunsupprimiert. An der Insel, die ein gesamtes Pfortaderästchen ausfüllt, ist noch keine Umgebungsreaktion erkennbar. Die zugehörige immunhistochemische Darstellung auf Insulin zeigt im gesamten Bereich der Insel eine deutliche braunrote Färbung, die insulin-positive Zellen und damit intakte B-Zellen nachweist (siehe Abb.51). Zusätzlich ist im HE-Bild eine Aufhellung der periinsulär gelegenen Hepatozyten erkennbar. Bei der Mehrzahl histologisch untersuchter Empfängertiere mit funktionierenden Inseltransplantaten war diese Erscheinung an einigen Stellen in der Leber zu finden. Hinter diesem Phänomen könnte man eine verstärkte Degranulation der umgebenden Hepatozyten vermuten, was als Folge einer erhöhten lokalen Insulinkonzentration in diesem Bereich zu deuten ist.

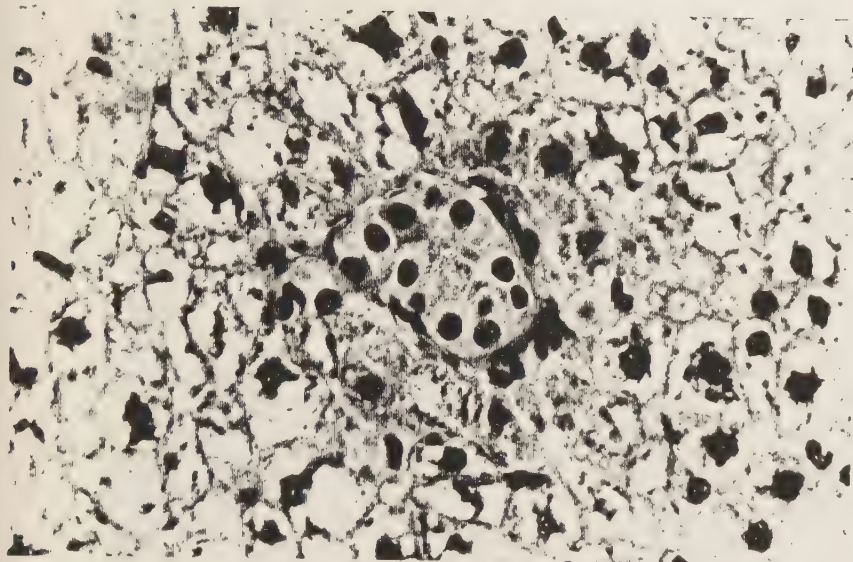


Abb. 50

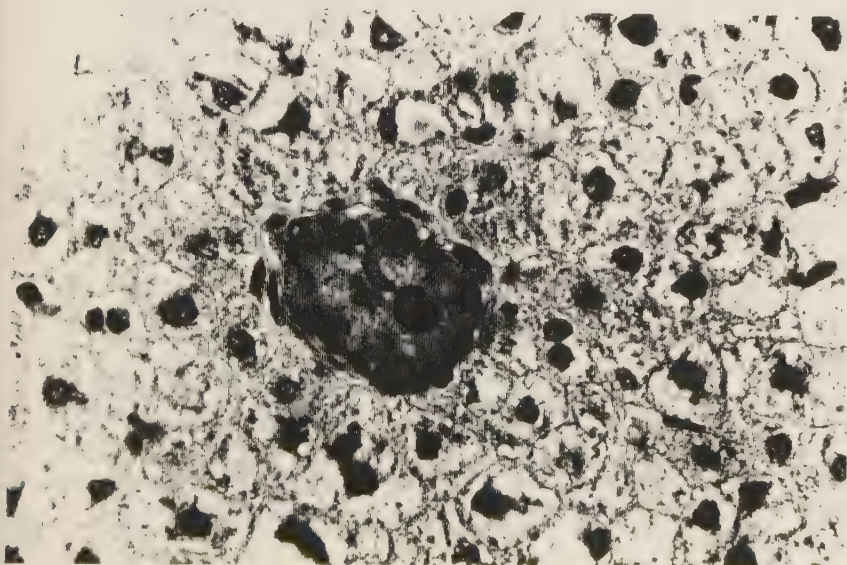


Abb. 51

In den beiden folgenden Abbildungen 52 und 53 ist eine Insel 15 Tage nach "pseudo"-isogener Transplantation ohne Immunsuppression dargestellt. Bei diesem Tier fanden sich klinisch Anzeichen einer beginnenden Abstoßung. Im Präparat läßt sich eine Einwanderung von lympho- und monozytären Zellen im Bereich der Insel feststellen. Die parallel durchgeführte immunhistochemische Färbung (Abb. 53) zeigt bereits eine Auflockerung der insulin-positiven Region und eine Einwanderung von Zellen in den Binnenraum der Insel.

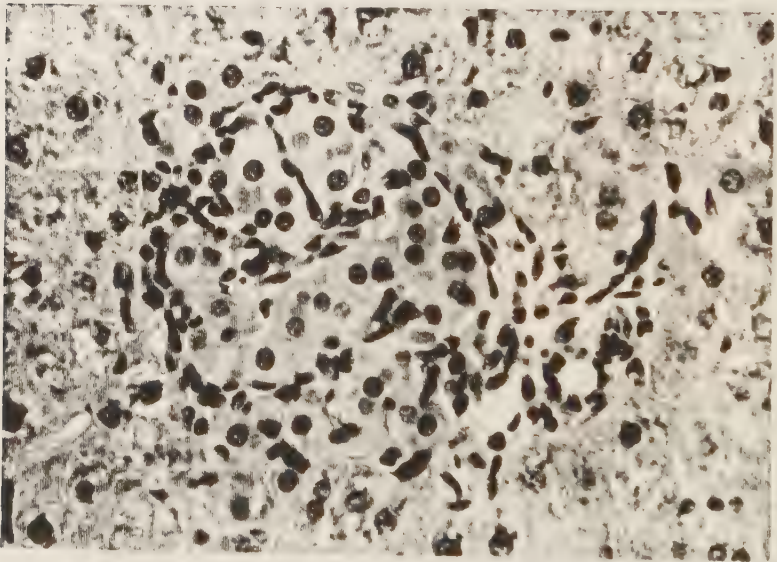


Abb. 52

Zur Untersuchung kamen auch langzeitüberlebende Inseltransplantate. Abbildung 54 und Abbildung 55 zeigen eine Insel eines "pseudo"-isogen transplantierten Tieres 50 Tage nach Transplantation im noch normoglykämischen Zustand. Eine nur mäßige Umgebungsreaktion ist im HE-Präparat erkennbar. Das zugehörige histochemische Präparat zeigt eine weitgehend intakte Insel ohne Anzeichen von beginnender Zerstörung des Transplantates.

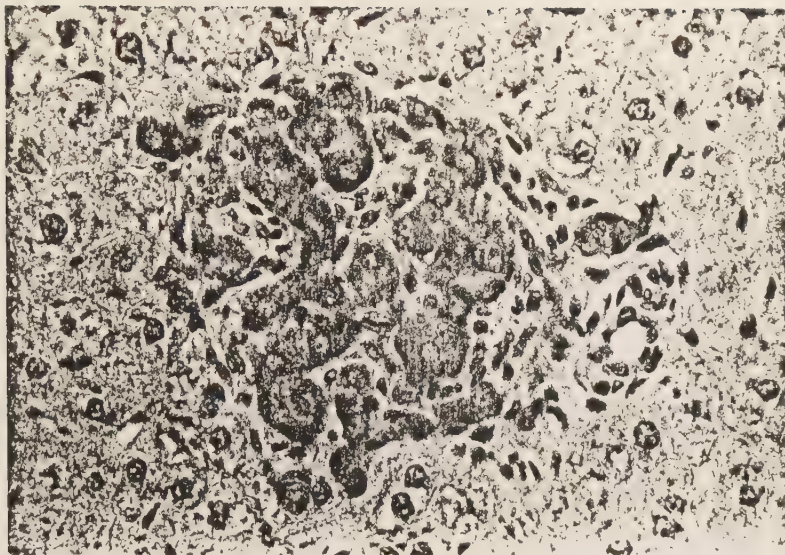


Abb. 53



Abb. 54

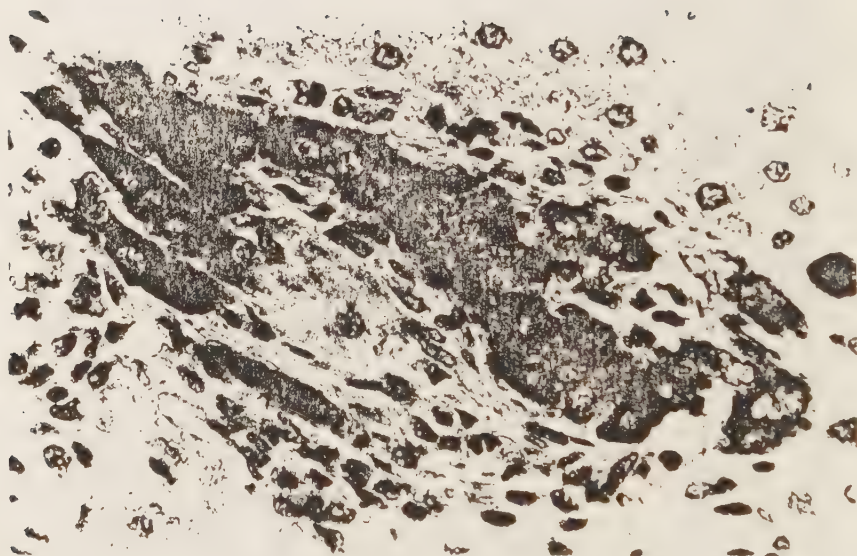


Abb. 55

Im Gegensatz dazu zeigen die beiden Abbildungen 56 und 57 eine allogene transplantierte Insel nach 75 Tagen mit einer beginnenden Transplantatabstoßung. Dieses Tier wies bereits eine gestörte Glukosetoleranz auf. Im HE-Bild ist bereits eine unscharfe Inselkontur mit gleichzeitiger Einwanderung von Zellen erkennbar. Noch deutlicher zeigt das immunhistochemische Präparat, daß der insulin-positive Bereich dieser Insel schon deutlich aufgelockert ist und die Gesamtstruktur trübe und verwischt erscheint.

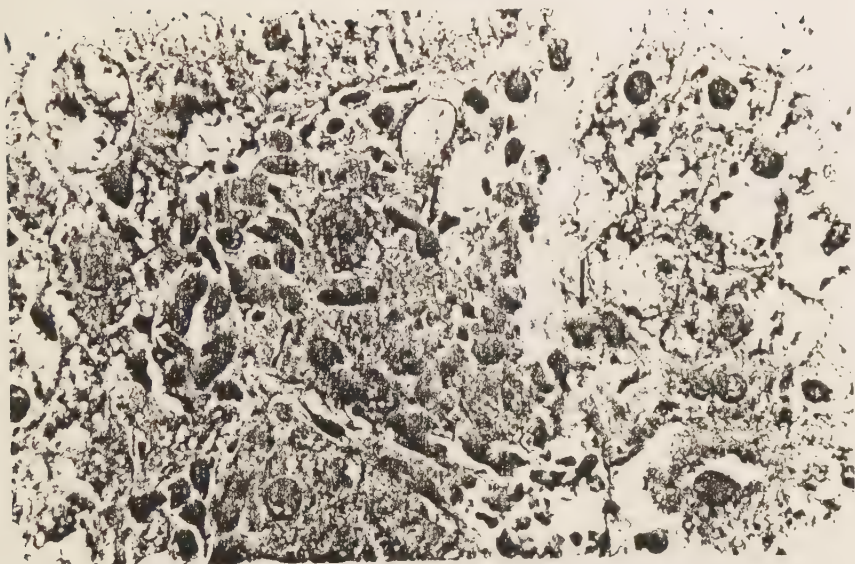


Abb. 56

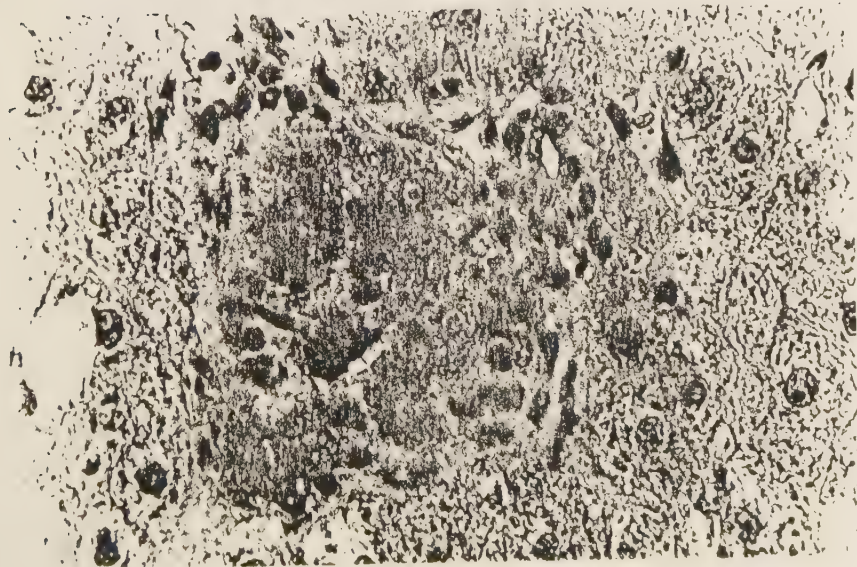


Abb. 57

Ein völlig reizloses Transplantat eines Langzeit-Überlebers zeigen die beiden nächsten Abbildungen 58 und 59, 110 Tage nach allogener Transplantation mit prä- und postoperativer Cyclosporine-Therapie zeigen sowohl HE- bzw. immunhistochemische Darstellung eine völlig intakte Langerhans'sche Insel ohne Anzeichen einer Umgebungsreaktion. Die immunhistochemische Abbildung 59 zeigt, daß die anatomische Struktur der Insel weitgehend erhalten geblieben ist und im Binnenbereich keinerlei eingewanderte Zellen zu finden sind.

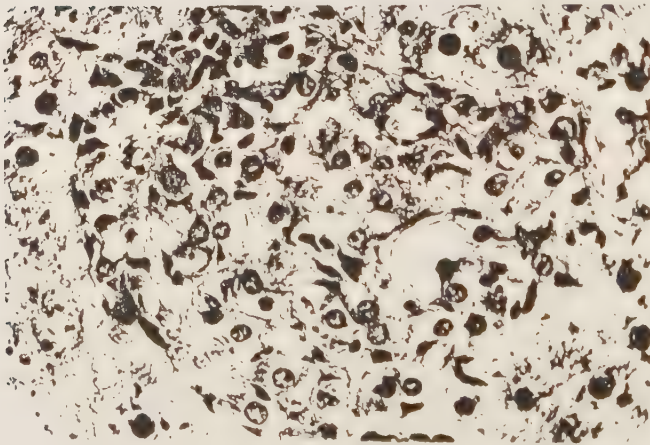


Abb. 58

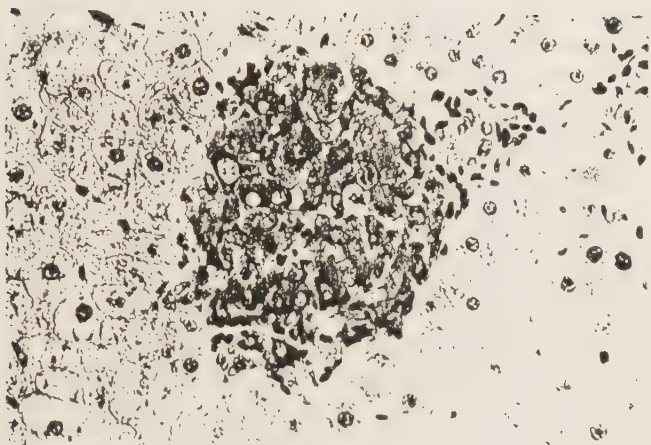


Abb. 59

Zum Schluß muß noch eine Besonderheit erwähnt werden, die im Bereich der Transplantate zu finden war. In fast allen Präparaten konnten eosinophile Granulozyten in den embolisierten Inseln gefunden werden. Diese Zellen sind normalerweise nicht Bestandteil des typischen Infiltrates, das sich z.B. bei der Transplantation im Streptozotocin-Modell fand (25,26).

Mit Ausnahme des Präparates 5 Tage nach allogener Transplantation (Abb.51) waren eosinophile Granulozyten auf allen Präparaten präsent (siehe Pfeile in den Abb. 52-58), besonders in denen mit beginnender Abstoßung Abb. 56 und 56.

Interessanterweise konnten diese Zellen auch in geringerem Maße bei frisch diabetischen Tieren angetroffen werden (Abb.46 und 47)

3.9. Zusammenfassung der Ergebnisse

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

- auch im BB/Wistar-Modell reicht eine portale Transplantation von 1000 Inseln aus einem Spender zur Normalisierung der Stoffwechsellage
- Inseln kurz nach dem "diabetic onset" transplantiert, werden schneller abgestossen als später transplantierte - besonders deutlicher Unterschied in der "pseudo"-isogenen Gruppe
- Allotransplantate unter post-operativer CsA-Therapie überleben 59 ± 8 Tage bei frisch diabetischen und $82,2 \pm 9$ Tage bei länger diabetischen Empfängern - vergleichbar mit dem Streptozotizin-Modell
- trotz post-operativer Gabe von CsA überleben "pseudo"-isogen transplantierte Inseln bei frisch diabetischen Empfängern mit $22 \pm 3,4$ Tagen nicht wesentlich länger als ohne Immunsuppression ($10 \pm 4,2$ Tage); bei länger diabetischen Empfängern wird die mittlere Überlebenszeit durch CsA um 42 Tage gesteigert
- prae- und post-operative CsA-Therapie verlängert die Überlebenszeiten in allen Gruppen, besonders jedoch in der "pseudo"-isogenen Gruppe

Abb. 60

Mit der modifizierten Neutral-Rot-Perfusionsmethode gelang es zwischen 800 und 1200 hochgereinigte Langerhans'sche Inseln aus einem Spenderpankreas zu isolieren. Durch in-vitro-Tests konnte demonstriert werden, daß isolierte Inseln der Transplantatpräparation funktionell intakt sind und auf einen Glukosereiz physiologisch reagieren. Die aus einem Spender isolierten Inseln reichten aus, den spontanen Diabetes der BB/Wistar-Ratte suffizient zu normalisieren. Ein latenter Diabetes konnte ausgeschlossen werden.

Transplantierte Inseln wurden im Modell der BB/Wistar-Ratte kurz nach dem "diabetic onset" schneller abgestoßen, als bei Transplantation in einem späteren Diabetesstadium. In allen Transplantationsgruppen ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen kurz- und langzeit-diabetischen Empfängern (Abb. 61). Jedoch waren die Unterschiede in den allogenen Gruppen weniger deutlich als in den "pseudo"-isogenen.

Die postoperative Immunsuppression mit Cyclosporine führte bei den Transplantationsgruppen zu einer unterschiedlichen Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit. Die Überlebenszeit allogener Inseln konnte durch dieses immunsuppressive Regime deutlich verlängert werden. Der Unterschied zwischen kurz- und langzeit-diabetischen Empfängern blieb signifikant (Abb. 61 und 62).

Gleichermaßen wirkte Cyclosporine bei den langzeit-diabetischen Empfängern von "pseudo"-isogenen Inseltransplantaten. Eine Steigerung der Überlebenszeit um 42 Tage wurde erzielt (Abb. 34) und damit der Bereich der allogenen Gruppen erreicht.

Trotz postoperativer Cyclosporine-Gabe überlebten "pseudo"-isogen transplantierte Inseln bei kurzzeit-diabetischen Empfängern im Durchschnitt nur $22 \pm 3,4$ Tage und blieben damit deutlich hinter den o.g. anderen Gruppen zurück (Abb. 34). Die postoperative Cyclosporine-Therapie führte in dieser Gruppe nicht zu der erwarteten Steigerung der Transplantatüberlebenszeit.

Durch eine kombinierte prä - und postoperative Cyclosporine-Therapie konnten die Transplantatüberlebenszeiten in allen Gruppen nochmals signifikant gesteigert werden (Abb. 61 und 62). Am deutlichsten wurde dies in der "pseudo"-isogenen Gruppe mit kurzzeit-diabetischen Inselempfängern. Unter prä- und postoperativer Cyclosporine-Therapie glichen sich die Unterschiede der "pseudo"-isogenen und allogenen Gruppen nahezu aus. In allen Gruppen wurden im Vergleich zur alleinigen postoperativen Therapie deutlich längere Überlebenszeiten erreicht (siehe Abb. 62).

Vergleich der Insel-Transplantatüberlebenszeiten bei Kurz- und Langzeit diabetischen BB/Wistar -Empfängern

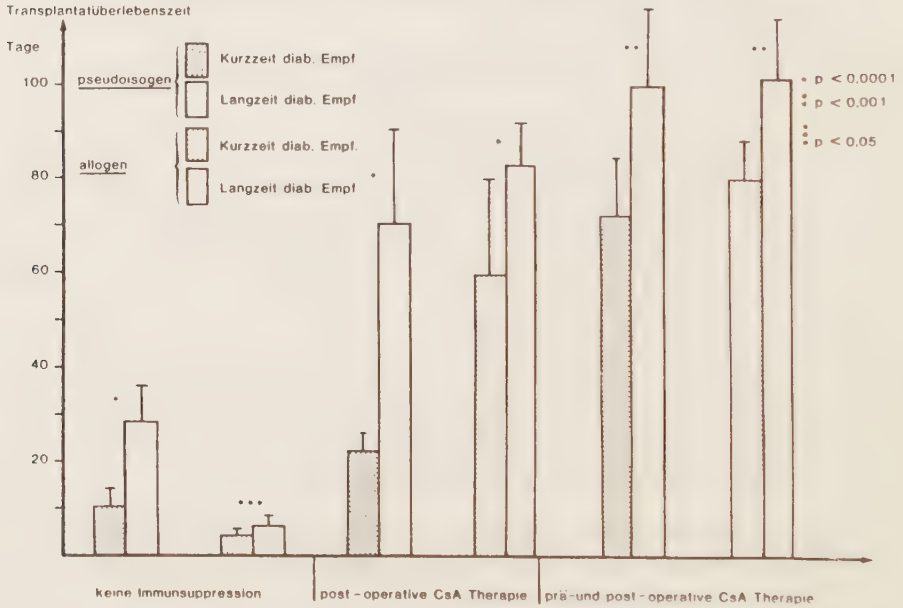


Abb. 61

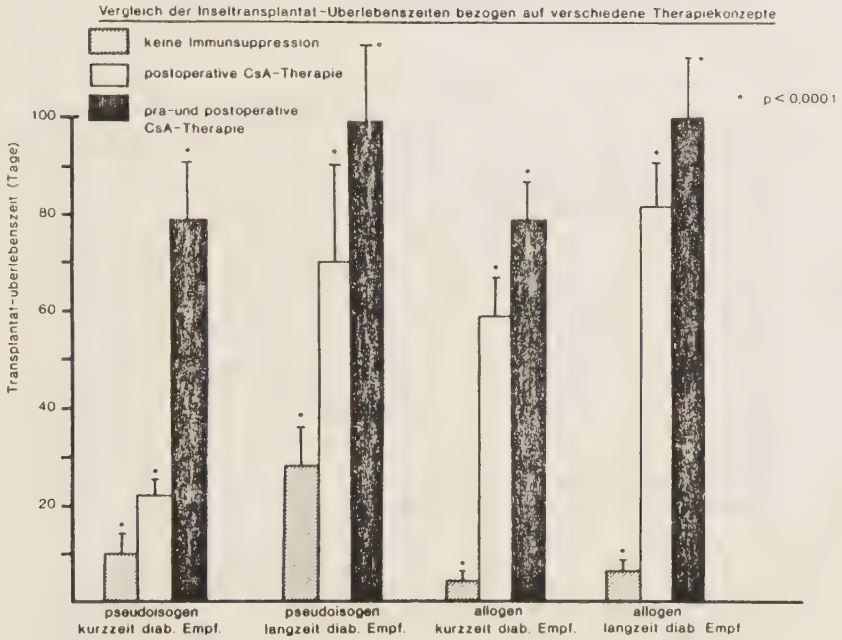


Abb. 62

4. Diskussionsteil

4.1. Diskussion der Methodik

Mit der modifizierten Neutral-Rot-Methode gelang es erstmals im Rattenmodell aus einem Spender die für einen Empfänger ausreichende Zahl an Langerhans'schen Inseln zu isolieren (25,26). Die isolierten Inseln der Transplantatpräparation sind weitgehend frei von lymphatischen bzw. exokrinen Verunreinigungen, wie histologische Untersuchungen zeigten (siehe 3.1., Abb. 18-20). Wir schreiben diese Steigerung der Ausbeute und der Reinheit der Transplantatpräparation mehreren Faktoren zu:

- a) Durch die Vitalfärbung der Langerhans'schen Inseln fällt es leichter diese nach der enzymatischen Aufbereitung im Pankreasgemisch zu erkennen. Dadurch wird der Anteil der Inseln, die beim Isolationsprozeß übersehen werden könnten, auf Grund ihrer Auffälligkeit, entsprechend reduziert.
- b) Die Vitalfärbung in Kombination mit einer flexiblen Verdauungszeit erleichtert eine exaktere Kontrolle des Verdauungsgrades während der enzymatischen Reaktion. Es ist wichtig, die Reaktion genau zum richtigen Zeitpunkt zu stoppen, denn dadurch kann verhindert werden, daß einerseits bei zu geringem Verdauungsgrad viele Inseln nicht vollständig aus dem umgebenden Gewebe herausgelöst sind und daß andererseits bei fortgeschrittenem Verdauungsgrad die isolierten Inseln weiter angegriffen und dadurch geschädigt werden können.

- c) Weiterhin ermöglicht die Vitalfärbung den Verzicht auf die Anwendung eines Dichtegradienten. Lacy und andere (41,92,130,133) berichten über gute Ergebnisse mit derartigen Gradienten im Rattenmodell. Diese Methode hat jedoch zwei entscheidende Nachteile. Zum einen geht eine große Anzahl der Inseln durch die vielen nötigen Zwischenschritte bei dieser Isolationsmethode verloren, zum anderen wird auch von einigen Autoren (25,26,41, 130,132) über den Verbleib von erheblichen Mengen lymphatischer und exogener Verunreinigungen nach Dichtegradienten-Zentrifugationen berichtet, was zusätzlich ein nachfolgendes Handpicken der Inseln erfordert. Wie morphologischen Untersuchungen zeigten, gibt es zusätzlich einen erheblichen Schwankungsbereich an Größe und Dichte bei Langerhans'schen Inseln im Pankreas. Dies ist für eine Dichtegradientenzentrifugation ein weiterer Nachteil, da durch einen Gradienten nicht der gesamte hydrogene Bereich der Inseln erfaßt werden kann.
- d) Die Kombination aus Vitalfärbung und Handpicken der Inseln erleichtert zudem die Elimination von Verunreinigungen der Transplantatpräparation, da eine exakte Trennung hierdurch sehr einfach möglich ist.

Als bedeutender Nachteil der Kombination von Neutral-Rot-Färbung und Handpicken der Inseln muß jedoch der erhebliche Arbeitsaufwand genannt werden, den der gründliche dreimalige Pickprozeß erfordert. Die Anwendung bei Großtiermodellen, wo eine erheblich höhere Anzahl von Inseln isoliert werden muß, erscheint deshalb von vornherein problematisch und verlangt eine Modifikation der etablierten Technik.

Die intraportale Injektion, die als Inseltransplantationsmethode gewählt wurde, erwies sich bei den durchgeführten Versuchen als unproblematisch. Die von verschiedenen Autoren (142,143) berichteten Komplikationen wie Pfortaderblutung, -Thrombose oder portale Hypertension traten nicht auf. Hierfür verantwortlich zu machen ist wohl der geringe Prozentsatz von lymphatischen und exogenen Verunreinigungen, besonders größerer Partikel, der Transplantatpräparation, in welcher mit Hilfe der modifizierten Neutral-Rot-Methode ein hoher Reinheitsgrad erreicht wird. Denn wie andere Versuche mit ungereinigten Transplantatpräparationen bei größeren Versuchstieren zeigten (142,153, 157), ist bei ungereinigter Transplantatpräparation die Milz als Implantationsort mit portaler Insulindrainage der Leber vorzuziehen (2,38,43,51). Außerdem bestehen Hinweise, daß die Reinheit der Transplantatpräparation auch für das Überleben der Inseltransplantate von Bedeutung ist, da mitinjiziertes lymphatisches Gewebe Abstoßungsprozesse begünstigen kann (25,26,137).

Als immunsuppressives Medikament wurde in den o.g. Versuchen Cyclosporine i.m. in den Konzentrationen 10 mg/kg Körpergewicht präoperativ und 25 mg/kg Körpergewicht postoperativ gegeben. Dieses bereits im Streptozotocinmodell (25,26,124,141) und bei Herztransplantation (99) erfolgreiche Applikationsschema wurde auf Grund folgender Gesichtspunkte angewendet:

- a) Eine orale Gabe ist bei Nagetieren methodisch außerordentlich schwierig und gewährleistet keine konstanten Blutspiegel von Cyclosporine (9,158).
- b) Die intravenöse Applikationsweise ist gleichermaßen kompliziert, da einerseits für jede Applikation eine Narkose nötig ist, andererseits um konstante Spiegel zu erzielen, häufige Injektionen durchgeführt werden müssen.
- c) Der Hauptvorteil einer intramuskulären Gabe von Cyclosporine liegt in der einfachen Handhabung. Inwieweit durch eine Depotwirkung und somit gleichmäßige Freisetzung von Cyclosporine aus dem

Muskel gleichmäßigere Blutspiegel erreicht werden, ist im Rattenmodell bisher noch ungeklärt. Die stichprobenartig durchgeführten Kontrollen der Cyclosporine-Spiegel transplantierte Tiere 15 und 70 Tage nach Transplantation zeigen zumindest auf, daß die Depotwirkung relativ lange anhält. Genauere Untersuchungen über die Pharmakokinetik nach intramuskulärer Injektion wurden noch nicht durchgeführt. Der bisherige Radioimmuno-Assay für Cyclosporine erlaubte routinemäßige Kontrollen noch nicht, weil für jede Bestimmung eine erhebliche Menge an Blut notwendig war (etwa 1 ml!).

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Vergleichbar zum Streptozotocin-Modell gelingt es in einer Ein-Spender/ Ein-Empfänger-Relation den spontanen Diabetes der BB/Wistar-Ratte mit etwa 1000 Inseln suffizient zu behandeln. Die hierfür nötige Steigerung der Inselausbeute ist durch die bereits beschriebenen Vorteile der Neutral-Rot-Methode gegenüber konventionellen Isolationsverfahren, erklärt. Die gleichzeitig als Qualitätsnachweis für die Inseln der Transplantatpräparation durchgeführten in vitro-Testungen zeigten, daß funktionell intakte Inseln zur Transplantation isoliert wurden.

Bei der Inseltransplantation ohne Immunsuppression wurden Inseln in der "pseudo"-isogenen Gruppe bei kurzzeitig-diabetischen Empfängern mit 10 Tagen und bei langzeit-diabetischen Empfängern mit 28 Tagen in relativ kurzer Zeit "abgestoßen". Dies spricht in erster Linie für eine autoimmunologische Zerstörung des transplantierten Gewebes, und bestätigt ähnliche Ergebnisse anderer Autoren (1.3.5.5.), denn wie Naji (108,109) berichtet, überleben "pseudo"-isogene Hauttransplantate ohne Immunsuppression bei BB/Wistar-Ratten länger als 100 Tage. Die

Erfahrung einer Vielzahl von experimentellen Transplantationsversuchen in starken und schwachen Abstoßungsmodellen ergibt (142), daß allogene transplantierte Haut in der Regel deutlich schneller abgestoßen wird als Langerhans'sche Inseln oder segmentale Pankreastransplantate. Trotz einer zuchtungsbedingten "Rest-Allogenität" bei der "pseudo"-isogenen Transplantation sprechen unsere Ergebnisse, in Einklang mit anderen (39,142,146,147), für eine wesentliche Beteiligung der autoimmunologischen Grunderkrankung an der Zerstörung von Inseltransplantaten.

Die in beiden allogenen Gruppen ohne Immunsuppression erzielten Überlebenszeiten mit 4 und 6 Tagen bei kurz- und langzeit-diabetischen Empfängern liegen im Bereich des für ein Abstoßungsmodell (53) zu erwartenden. Ausgehend von den "pseudo"-isogenen Gruppen ohne Immunsuppression, wo sich ein deutlicher Unterschied der Überlebenszeiten bei kurz- und langfristig-diabetischen Empfängern von Inseltransplantaten auffiel, wurden alle "pseudo"-isogenen und allogenen Gruppen nach kurz- und langzeit-diabetischen Empfängern unterteilt. Bei statistischer Auswertung und Vergleich bezüglich des Diabetesstadiums ergab sich in allen Gruppen, daß Inseln kurz nach dem "diabetic onset" schneller abgestoßen werden als bei Transplantation zu einem späteren Zeitpunkt. Bei den "pseudo"-isogenen Gruppen, auch mit immunsuppressiver Therapie, zeigten sich die weitaus deutlichsten Unterschiede zwischen kurz- und langzeit-diabetischen Empfängern (siehe Abb. 61 und 62). Betrachtet man die immunologische Situation um den Zeitpunkt des "diabetic onset", so läßt sich die schlechtere Überlebenszeit der in diesem Zeitraum transplantierten Inseln durch die noch stark aktiven autoimmunologischen Prozesse, die in dieser Phase ablaufen, erklären. Als Ausdruck dessen, findet sich sowohl bei der BB/Wistar-Ratte wie auch beim Menschen, um den Zeitpunkt des "diabetic onset" herum, das Maximum von B-Zell-spezifischen Autoantikörpern und anderen unspezifischen autoimmunologischen Faktoren (30,31,32,57,59,84,87,89,90,98,119). Beim Menschen nehmen diese Autoimmunfaktoren bis zum 2. Jahr

"post onset", bei der BB/Wistar-Ratte bis zum 25. Tag "post onset" deutlich ab (30,31,87,98,119). Histologische Untersuchungen an der Langerhans'schen Insel beim Menschen und der BB/Wistar-Ratte zeigen in dem für die Antikörper genannten Zeitraum das Maximum der "Insulitis", als morphologische Ausdrucksform der an der Langerhans'schen Insel ablaufenden Autoaggressionsprozesse. Da im Endstadium des Typ-1-Diabetes die "Insulitis" verschwindet und kaum noch inselspezifische Antikörper nachweisbar sind (30-32,56,57,87,98,119), könnte man die signifikant längeren Überlebenszeiten von Inseltransplantaten mit der reduzierten autoimmunologischen Aktivität im späteren Diabetesstadium bei der BB/Wistar-Ratte erklären.

Bei den allogenen Transplantationsgruppen ohne Immunsuppression fand sich nur ein kleiner, gerade noch signifikanter Unterschied zwischen kurz- und langzeit-diabetischen Empfängern, der sich jedoch in den Therapiegruppen mit postoperativer bzw. prä- und postoperativer Immunsuppression deutlich verstärkte (Abb. 61 und 62).

Bis vor einiger Zeit war es nicht klar, ob auch bei allogener Transplantation die bestehende autoimmunologische Grundkrankheit eine Zerstörung des Transplantats verursachen kann. In den letzten Jahren ergaben sich jedoch aus der Literatur mehr und mehr Hinweise und Beobachtungen, die für diese Möglichkeit der Transplantatzerstörung sprechen. Leimenstoll (81) berichtet dies für die Nierentransplantation, Sutherland und andere (138,142,143,146,147) für die segmentale Pankreastransplantation. Im Rahmen der experimentellen Inseltransplantation stammt der jüngste Bericht von Prowse (121), der bei allogener Inseltransplantation im Modell der BB/Wistar-Ratte die autoimmunologische Zerstörung von Inseln nachweisen konnte.

Unsere Ergebnisse bei der allogenen Transplantation im BB/Wistar-Modell bestätigen deshalb somit die von den anderen Autoren gemachten Beobachtungen. Die Tatsache, daß sich bei den Versuchen ohne Immun-

suppression die geringsten Unterschiede vorfanden, erklären wir damit, daß sich im gewählten starken Abstoßungsmodell (Lewis auf BB/Wistar), in dem die Überlebenszeiten ohne Immunsuppression ohnehin nur im Bereich von wenigen Tagen liegen, die zusätzliche autoimmunologische Komponente nicht mehr wesentlich bemerkbar macht. Wird nun die "konventionelle Abstoßung" mit Cyclosporine unterdrückt, kommt der autoimmunologische Grundprozeß, der vorher von der bestehenden Histoinkompatibilität überlagert wurde, stärker zum Tragen. Die Ergebnisse bei der Transplantation mit alleiniger postoperativer bzw. prä- und postoperativer Immunsuppression, wobei sich der Unterschied zwischen kurz- und langzeitdiabetischen Empfängern verdeutlicht, können deshalb als Bestätigung unserer Erklärung gedeutet werden.

Die postoperative Immunsuppression mit Cyclosporine führte in beiden allogenen Transplantationsgruppen und ebenso bei den langzeitdiabetischen Empfängern von "pseudo"-isogenen Inseln zu einer deutlichen Verlängerung dieser Transplantatüberlebenszeiten (siehe Abb. 61,62,34). Dies entspricht weitgehend dem bereits im Streptozotocin-Modell erzielten Ergebnissen (25,26). Wie bereits erwähnt, überlebten allogen-transplantierte Inseln bei langzeit-diabetischen Empfängern signifikant länger (siehe Abb. 61).

Überraschenderweise ließ sich jedoch die Transplantatüberlebenszeit von "pseudo"-isogen transplantierten Inseln bei kurzzeit-diabetischen Empfängern durch postoperative Cyclosporine-Gabe nicht wesentlich steigern. Wir führen dies wiederum auf die gesteigerte autoimmunologische Aktivität im Diabetes-Frühstadium zurück. Die postoperative Cyclosporine-Therapie scheint hier zu spät in die bestehende immunologische Situation einzugreifen, wodurch offensichtlich keine ausreichende Protektion der Inseln garantiert wird. In einem späteren Diabetesstadium mit geringerer autoimmunologischer Aktivität hingegen zeigt das gleiche Therapieregime eine deutliche, und mit den allogenen Gruppen vergleichbare, Wirkung.

Ein weiterer Aspekt leitet sich aus der letztgenannten Transplantationsgruppe ab. Die nur geringe Steigerung der Überlebenszeiten bei den "pseudo"-isogen transplantierten kurzzeit-diabetischen Empfängern bestätigt zusätzlich nochmals, daß bei den "pseudo"-isogenen Transplantationen im BB/Wistar-Modell trotz nicht bestehender streng isogener Verhältnisse für Inseltransplantate wohl die autoimmunologische Komponente bei "pseudo"-isogener Transplantation im Vordergrund steht. Bei den allogenen Gruppen konnte jedoch trotz einer starken bestehenden Histoinkompatibilität eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeiten erreicht werden.

Die Berichte über den Erfolg der Cyclosporine-Therapie im "diabetic onset" aus der Klinik (141) und im BB/Wistar-Modell (80,86) bestätigen, daß Cyclosporine prinzipiell die Möglichkeit besitzt, bestehende auto-immunologische Prozesse günstig zu beeinflussen. Deshalb wurde die alleinige postoperative Cyclosporine-Gabe durch eine präoperative zu ergänzt, unter der Vorstellung, die bestehende Autoimmunitätslage dadurch für eine geplante Inseltransplantation günstig zu beeinflussen.

Mit diesem geänderten immunsuppressiven Konzept gelang es, bei allen Transplantationsgruppen die Überlebenszeit von Inseln nochmals signifikant zu verlängern (Abb. 61 und 62). Den deutlichsten Anstieg bot nun die Gruppe der kurzzeitig-diabetischen Empfänger von "pseudo"-isogenen Inseln, die bei postoperativer Cyclosporine-Therapie am schlechtesten abschnitt. Sie erreichte nun das Niveau der korrespondierenden allogenen Gruppe. Auch bei den langzeitdiabetischen Empfängern konnte mit diesem Therapieregime die durchschnittliche Überlebenszeit nochmals verlängert werden. Hier wurden mit Abstand die längsten Überlebenszeiten erreicht und es bestand kein Unterschied zwischen der "pseudo"-isogenen und der allogenen Gruppe.

Man könnte diesen erneuten Anstieg der Überlebenszeiten auf eine Erhöhung der Gesamtdosis von Cyclosporine zurückführen. Bei den allerdings nur stichprobenartig bestimmten Cyclosporine-Spiegeln fand sich keine Erhöhung im Vergleich zur alleinigen postoperativen Therapie.

Interessanterweise zeigten die "pseudo"-isogen transplantierten kurzzeitdiabetischen Empfänger, bei denen eine hohe autoimmunologische Aktivität zu erwarten ist, unter der letztgenannten Therapie den deutlichsten Anstieg der Inselüberlebenszeiten (Abb. 61,62).

Letztere Ergebnisse bestätigen deshalb die Vorstellung, daß Cyclosporine einerseits die bestehende Autoimmunitätslage bei diabetischen Empfänger für Inseltransplantate günstig beeinflussen kann, andererseits wirksam allogene Abstoßungsprozesse verhindert werden können (26,29, 48,49,124). Dies gilt für "pseudo"isogene wie für allogene Transplantate im BB-Modell gleichermaßen. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, gibt es mehr und mehr Hinweise dafür, daß Allotransplantate ebenfalls von Autoimmunprozessen angegriffen werden können (81,138,146,147).

Als möglicher histopathologischer Ausdruck des spezifischen autoimmunologischen Geschehens konnten neben dem lympho-monozytaren Infiltrat in allen untersuchten Transplantaten auch eosinophile Granulozyten gefunden werden, die im Rahmen der "normalen" Transplantationsabstoßung, z.B. im Streptozotocin-Modell (25,26) nicht auftraten. Dies bestätigt erst kürzlich von Prowse (121) Veröffentlichtes. Er beobachtete ebenfalls bei allogener Inseltransplantation im BB-Modell Infiltrate von eosinophilen Granulozyten und auch Mastzellen. Da sich diese Zellen auch im Bereich der Inseln vor der klinischen Manifestation des Diabetes fanden, liegt die Vermutung für eine ursachliche Beteiligung der gefundenen eosinophilen Granulozyten an der Inselzerstörung nahe. Die weitere Aufklärung dieser Erscheinungen muß deshalb Ziel weiterer Untersuchungen sein.

Als mögliche Konsequenz aus den beobachteten Ergebnissen leitet sich ab, daß die Wahl des Transplantationszeitpunktes beim Diabetiker abgewogen werden muß: nicht zu früh nach dem "diabetic onset" mit Blick auf die autoimmunologische Situation, aber auch nicht zu spät, der auftretenden Komplikationen wegen. Eine praoperative Immunsuppression zur Beeinflussung der Immunitätslage wäre zusätzlich eine denkbare Ergänzung der bisherigen immunsuppressiven Konzepte.

5. Zusammenfassung

Im spontanen Diabetesmodell der BB/Wistar-Ratte, das auf Grund der immunologischen Genese des Diabetes dem Menschen sehr nahe steht, wurden die Wirkung autoimmunologischer Vorgänge auf transplantiertes Gewebe untersucht.

Hierzu wurden "pseudo"-isogene und allogene Inseltransplantationen zu verschiedenen Zeitpunkten mit autoimmunologischer Aktivität beim diabetischen Empfänger durchgeführt. Zusätzlich wurde mit Cyclosporine bzw. prä- und postoperativ immunsupprimiert.

Anhand der erzielten Transplantatüberlebenszeiten wurde versucht, einerseits den Einfluß der Autoimmunitätslage auf allogene bzw. "pseudo"-isogene Transplantate zu beurteilen und andererseits die Zerstörung der Transplantate durch Immunsuppression wirksam zu verhindern.

Langerhans'sche Inseln wurden mittels einer modifizierten Neutral-Rot-Methode isoliert und nach mehrfacher Reinigung intraportal transplantiert. Von einem Spender wurden etwa 1000 Inseln isoliert und damit ein Empfänger suffizient transplantiert. Transplantate wurden im postoperativen klinischen Verlauf beobachtet und bei einzelnen Tieren histologisch und immunhistochemisch untersucht.

Die durchgeführten Versuche ergaben, daß Inseltransplantate bei der BB/Wistarratte im frühen (bis 20 Tage) Diabetesstadium bei "pseudo"-isogener wie allogener Transplantation gleichermaßen schneller zerstört werden als im späteren Stadium (12 Wochen). Dieser Befund kann durch die erhöhte autoimmunologische Aktivität in dieser Phase erklärt werden .

Postoperative Cyclosporine-Therapie kann bei allogener Transplantation sowie "pseudo"-isogener Therapie im Spätstadium eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeiten erzielen, nicht jedoch im Frühstadium.

Mit gleichzeitiger pra- und postoperativer Cyclosporine-Therapie lassen sich in allen Gruppen jedoch die weitaus längsten Überlebenszeiten erzielen. Dieses Schema kann somit als effektivste Immunsuppression gelten, weil sie vielleicht bereits vor Transplantation die bestehende Autoimmunitätslage günstig beeinflusst.

Trotz Immunsuppression bleiben die Unterschiede im diabetischen Früh- und Spätstadium in allen Gruppen erhalten! Als histopathologischer Ausdruck des autoimmunologischen Geschehens könnte man die in den Transplantaten gehäuft auftretenden eosinophilen Granulozyten deuten, die im gleichen Versuchsansatz beim Streptozotocin-Diabetes nicht zu finden waren.

VERZEICHNIS HISTOLOGISCHER ABBILDUNGEN:

- Abb. 18 Isolierte Langerhans'sche Insel der Transplantatpräparation, Neutral-Rot-Vitalfärbung, Vergrößerung 100fach.
- Abb. 19 Isolierte Langerhans'sche Insel der Transplantatpräparation, HE-Färbung, Vergrößerung 200fach.
- Abb. 20 Isolierte Langerhans'sche Insel der Transplantatpräparation, Immunhistochemie auf Insulin, Vergrößerung 150fach.
- Abb. 40 Langerhans'sche Insel im Pankreas, Kontrolltier, HE-Färbung, Vergrößerung 200fach.
- Abb. 41 Langerhans'sche Insel im Pankreas, Kontrolltier, Immunhistochemie auf Insulin, Vergrößerung 150fach.
- Abb. 42 Langerhans'sche Insel im Pankreas, Kontrolltier, Immunhistochemie auf Glukagon, Vergrößerung 250fach.
- Abb. 43 Langerhans'sche Insel im Pankreas, Kontrolltier, Immunhistochemie auf PP-Zellen, Vergrößerung 200fach.
- Abb. 44 "Insulitis", subklinisch-diabetische BB-Ratte, 55 Tage alt, HE-Färbung, Vergrößerung 50fach.
- Abb. 45 "Insulitis", subklinisch-diabetische BB-Ratte, 55 Tage alt, HE-Färbung, Vergrößerung 200fach.
- Abb. 46 "Insulitis", subklinisch-diabetische BB-Ratte, 55 Tage alt, Immunhistochemie auf Insulin, Vergrößerung 200fach.
- Abb. 47 "Insulitis", subklinisch-diabetische BB-Ratte, 75 Tage alt, Immunhistochemie auf Insulin, Vergrößerung 150fach.
- Abb. 48 Diabetische BB/Wistar-Ratte, 94 Tage alt, Langerhans'sche Inseln, HE-Färbung, Vergrößerung 200fach.
- Abb. 49 Diabetische BB/Wistar-Ratte, 94 Tage alt, Langerhans'sche Inseln, Immunhistochemie auf Insulin, Vergrößerung 200fach.
- Abb. 49a Diabetische BB/Wistar-Ratte, 94 Tage alt, Langerhans'sche Inseln, Immunhistochemie auf Glukagon, Vergrößerung 200fach.

- Abb. 50 Allogenes Inseltransplantat 5 Tage nach Transplantation, HE-Färbung, Vergrößerung 200fach.
- Abb. 51 Allogenes Inseltransplantat 5 Tage nach Transplantation, Immunhistochemie auf Insulin, Vergrößerung 200fach.
- Abb. 52 "Pseudo"-isogenes Inseltransplantat, 15 Tage nach Transplantation, beginnende Abstoßung, HE-Färbung, Vergrößerung 180fach.
- Abb. 53 "Pseudo"-isogenes Inseltransplantat, 15 Tage nach Transplantation, beginnende Abstoßung, Immunhistochemie auf Insulin, Vergrößerung 180fach.
- Abb. 54 "Pseudo"-isogenes Inseltransplantat, 50 Tage nach Transplantation, HE-Färbung, Vergrößerung 180fach.
- Abb. 55 "Pseudo"-isogenes Inseltransplantat, 50 Tage nach Transplantation, Immunhistochemie auf Insulin, Vergrößerung 180fach.
- Abb. 56 Allogenes Inseltransplantat, 75 Tage nach Transplantation, beginnende Abstoßung, HE-Färbung, Vergrößerung 200fach.
- Abb. 57 Allogenes Inseltransplantat, 75 Tage nach Transplantation, beginnende Abstoßung, Immunhistochemie auf Insulin, Vergrößerung 200fach.
- Abb. 58 Allogenes Inseltransplantat, 110 Tage nach Transplantation, HE-Färbung, Vergrößerung 150fach.
- Abb. 59 Allogenes Inseltransplantat, 110 Tage nach Transplantation, Immunhistochemie auf Insulin, Vergrößerung 150fach.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Albert E, Scholz S,
Institut f. Immunogenetik, LMU München
Persönliche Mitteilung 1986
2. Alderson D, Farndon JR
"Effect of transplant mass on insulin release by collagenase
dispersed pancreatis islets in the diabetic dog."
World Journal of Surgery, Vol.8, S:598, 1984
3. Asplin CM, Cooney MK, Crosslye JR, Dornan TL, Raghu D, Palmer JP
"Coxsackie-B₄-infection and isletcell-antibodies three years
before overt diabetes"
Journal of Pediatrics 101, S:398, 1982
4. Bell RN, Fernandez-Cruz L, Brimm J, Lee S, Sayers H, Orloff MJ
"Prevention of glomerular basement membrane thickening in alloxan-
diabetes"
Surgery 88, S:31, 1980
5. Bell PRF, Wood RFM, Peters M, Nash JR
"Comparison of various methods of chemical immunosuppression in
islet cell transplantation"
Transplantation Proceedings 12, S:291, 1980
6. Bensley RR
"Studies on the pancreas of the guinea pig"
American Journal of Anatomy 3, S:297, 1912
7. Bersani G, Zanco P, Padovan P, Betterle C
"Lymphocyte subpopulations in insulin-dependent diabetics with and
without serum islet-cell antibodies"
Diabetologia 20, S:47, 1981
8. Bertram J, Baur MP
"Insulin-dependent diabetes mellitus"
in: "Histocompatibility testing 1984", S:348
ed: Albert ED, Baur MP, Mayr WR, Springer-Verlag, Berlin/New York
1984
9. Beveridge T
Pharmacokinetics and metabolism of Cyclosporine A"
In: "Cyclosporine A", Ed: White DJG, Elsevier Biomedical Press,
Amsterdam/New York/Oxford, S:35, 1982
10. Bewick M
"Pancreatic allotransplantation in dogs and its relevance to the
treatment of diabetes mellitus in man"
Thesis Manual Surgery, University of Cambridge, 1976
11. Bewick M, Mundy AR, Eaton B, Watson F
"The endocrine function of the heterotopic pancreatic
allotransplant in dogs:
I. Normal and rejection, Transplantation 31, S:15, 1981

12. Beyer MM, Friedman EA
 "Histocompatibility-dependen long term islet of Langerhans survival induced by anti-thymocyte globulin"
 Transplantation Proceedings 11, S:1136, 1979
13. Bobzien B, Yasunamie Y, Majercik M, Lacy PE, Davie JM
 "Intratesticular transplants of islet xenografts (rat to mouse)"
 Diabetes 32, S:213, 1983
14. Boitard C, Debray-Sachs M, Pouplard A, Assan R, Hamburger J
 "Lymphocytes from diabetics suppress insulin release"
 Diabetologia 21, S:46, 1981
15. Bowen KM, Prowse SJ, Lafferty KJ
 "Reversal of diabetes by islettransplantation: vulnerability of the established allograft"
 Science 213, S:1261, 1981
16. Brons IGM, Caine RY, Rolles K, Olczak S, Evans DB
 "Paratopic segmental pancreas with segmental kidney transplantation in man: a one year follow-up study"
 Transplantation Proceedings (in press) ESOT Congress 1985
17. Brown I, Clark WR, Markoff RK, Mullen YS
 "Pancreas transplantation for diabetes mellitus"
 American Internal Medicine 89, S:954, 1978
18. Brown I, Clark WR, Molnar G, Mullen YS
 "Fetal pancreas transplantation for reversal of streptozotocin-induced diabetes in rats"
 Diabetes 25, S:56, 1976
19. Brown I, Mullen YS, Clark WR, Molnar G, Heininger D
 Importance of hepatic portal circulation for insulin action in Streptozotocin-diabetic rats transplanted with fetal pancreas"
 Journal of Clinical Investigation 64, S:1688, 1979
20. Burmester GR
 "Diabetes mellitus Typ I und Cyclosporine A - eine alternative Therapieform"
 Diabetes Dialog 2, S:4, 3/1985
21. Buschard K
 "Cultivation of islets of Langerhans in a Milipore^R chamber in vivo"
 Hormonal Metabolism Research 7, S:441, 1975
22. Buschard K, Röpke C, Madsbad S, Mehlsen J, Rygaard J
 "T-Lymphocyte subsets in patients with newly diagnosed type 1 (insulin-dependent) diabets: a prospective study"
 Diabetologia 25, S:247, 1983

23. Buse JB, Ben-Wun A, Klein KA, Eisenbarth GS, Seidmann IG, Jackson RA
"Specific class II histocompatibility gene polymorphism in BB rats"
Diabetes 33, S:700, 1984
24. Cahill GF, McDewitt HO,
"Insulin dependent diabetes mellitus: the initial lesion"
New England Journal of Medicine 304, S:1454, 1981
25. Dibelius A
Inauguraldissertation
Aus dem Institut für Chirurgische Forschung, 1986
26. Dibelius A, Königsberger H, Walter P, Permanetter W, Brendel W, von Specht BU
"One donor one recipient pancreatic islets transplantation in the rat and longterm graft survival by initial Cyclosporine treatment of recipients"
Transplantation (in press) 1986
27. Downing R, Scharp DW, Ballinger WF
"An improved technique for the isolation and identivication of mammalian islets of Langerhans"
Transplantation 29, S:79, 1980
28. Dubernard JM, Traeger J, Bosi E, Gelet A, El Yafi S, Devonec M, Piatti PM, Chiesa R, Martin X, Mongin-Long D, Jouraine JL, Pozza G
"Transplantation for the treatment of IDDM: clinical experience with polymere-obstructed pancreas grafts using Neoprene"
World Journal of Surgery 8, S:262, 1984
29. Dulin B, Soret MG
"Chemically and hormonally induced diabetes"
In: Volk BW, Wellman KF
Editors "The diabetic pancreas", New York Plenum Press, S:425, 1977
30. Dyrberg T, Nakhooda AF, Baekkeskov S, Lernmark A, Poussier P, Marliiss EB
"Islets cell surface antibodies and lymphocyte antibodies in the spontaneous diabetic BB/Wistar rat"
Diabetes 31, S:278, 1982
31. Dyrberg T, Poussier P, Nakhooda AF, Marliiss EB, Lernmark A
"Islet cell surface and lymphocyte antibodies often preceede the spontaneous diabetes in the BB/W rat"
Diabetologia 26, S:159, 1984
32. Eisenbarth GS
"Autoimmune beta cell insufficiency - diabetes mellitus type I"
Triangle 23 3/4, S:111, 1984

33. Eisenbarth GS, Jackson RA
In: Immunogenetics of polyglandular failure and related diseases in HLA and endocrine disease"
Ed.N.Farid, Academic Press, New York, S:235, 1981
34. Elliot RB, Crossley JR, Berryman CC, James AG
"Partial preservation of pancreatic beta-cell function in children with diabetes"
Lancet II, S:1, 1981
35. Elliot RB, Martin JM
"Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB/W rat"
Diabetologia 26, S:297, 1984
36. Faustmann D, Hauptfeld V, Lacy PE, Davie JM
"Prolongation of murine islet allograft survival by pretreatment of islet with antibody directed to Ia-determinants"
Proc. Natl. Acad. Sci., USA 78, S:5156, 1981
37. Faustmann D, Lacy PE, Davie JM, Hauptfeld V
"Prevention of allograft rejection by preimmunisation with donor blood depleted of Ia-bearing cells"
Science 217, S:157, 1982
38. Feldmann S, Hirschberg G, Dodi G, Raiznor M, Scharp DW, Ballinger WF, Lacy PE
"Intrasplenic islet isografts"
Surgery 82, S:386, 1977
39. Festing HFW, Staats E
"Standardized nomenclature of inbred strains of rats - Fourth listening"
Transplantation 16, S:221, 1973
40. Finch DRA, Morris PJ
"Failure to demonstrate a synergistic effect between enhancing serum and ALS in recipients of pancreatic islet allografts"
Transplantation 23, S:386, 1977
41. Finke EH, Lacy PE, Ono J
"Use of reflected green-light for specific in vitro identification of islets following collagenase isolation"
Diabetes 28, S:612, 1979
42. Fischer LJ, Rickert DE
"Pancreatic islet cell-toxicity"
Critical Review of Toxicology S:231, 1975

43. Florack G, Ward S, Sutherland DER, Hesse U, Squifflet JP
 "Metabolic studies after heterotopic segmental pancreas and
 intrasplenic islet-cell-transplantation"
 Transplantation Proceedings (in press) ESOT Congress 1986
44. Foster DW
 "Diabetes mellitus"
 in Harrison's "Principles of Int.Med." S:661
 ed: Petersdorf RG, Adams RD, Braunwald E, Isselbacher KJ,
 Martin JB, Wilson JD; Mc Graw-Hill 10th Edition
45. Garvey JFW, McShane P, Poole MD, Millard PR, Morris PJ
 "The effect of Cyclosporine A on experimental pancreas allografts
 in the rats"
 Transplantation Proceedings 12, S:266, 1980
46. Garvey JFW, Morris PJ, Finch DRA
 "Experimental Pancreas Transplantation"
 Lancet 1, S:971, 1979
47. Gebel HM, Yasunami Y, Dieckgrafe B, Davie JM, Lacy PE
 "Islet-bearing cells within isolated canine islets"
 Transplantation 36, S:346, 1983
48. Gray DWR, Morris PJ
 "Cyclosporine and pancreas transplantation"
 World Journal of Surgery 8, S:230, 1984
49. Gray DWR, Reece-Smith H, Fairbrother B, McShane P, Morris PJ
 "Isolated pancreatic islet allografts in rats immunologically
 unresponsive to renal allografts"
 Transplantation 37, S:434, 1984
50. Gries FA, Koschinsky T, Todler M
 "Diabetes mellitus"
 in: "Lehrbuch der Inneren Medizin"
 ed: Siegenthaler W, S:15.12, G.Thieme-Verlag, Stuttgart/New York,
 1984
51. Griffin SM, Alderson D, Farndon JR
 "An improved harvesting technique for pancreatic islet
 transplantation"
 Transplantation Proceedings (in press) ESOT Congress, 1986
52. Griffith RC, Scharp DW, Hartman BK, Ballinger WF, Lacy PE
 "A morphologic study of intra-hepatic portal vein islet isografts"
 Diabetes 26, S:201, 1977
53. Günther B, Stark O
 "The major histocompatibility system of the rat"
 in: "The major histocompatibility system in man and animals"
 ed: Göke D, Springer-Verlag, 1977

54. Hegre OD, Hichly GE, Marshall S, Serie JR
 "Modification of allograft immunogenicity in perinatal islets isolated and purified in vitro"
 Transplantation 37, S:227, 1984
55. Hegre OD, Leonard RJ, Erlandson SL, McEvoy RC, Parsons JA, Eide RP, Lazarow A
 "Transplantation of islet tissue in the rat"
 Acta Endocrinologica (Suppl. 205) Copenhagen 184, S:94, 1976
56. Helmke K
 "Islet-cell-antibodies and islet-cell-function in human diabetes"
 in: "Virus and autoimmunity in diabetes mellitus"
 Behring-Institut Research Communication 1983
57. Helmke K, Seitz M, Brockhaus R, Weimer R, Otten A, Federlin K
 "Autoimmunphänomene beim Diabetes mellitus"
 Immunologie und Infektion 11, S:199, 1983
58. Hevely MA, Lau HT, Weber C, Reemtsma K
 "Pancreatic islet transplantation: Immunoalteration with UV-irradiation"
 World Journal of Surgery 8, S:207, 1984
59. Irvine WJ, McCallum CJM, Gray RS, Ampbell J, Duncan LJP, Farquhar JW, Vaughan H, Morris PJ
 "Pancreatic islet-cell-antibodies in diabetes mellitus correlated with the duration and type of diabetes, coexistent autoimmune disease and HLA type"
 Diabetes 26, S:138, 1977
60. Jackson RA, Morris MA, Haynes EF, Eisenbarth GS
 "Increased circulating Ia-antigen-bearing T-cells in type I diabetes mellitus"
 New England Journal of Medicine 306, S:785, 1982
61. Jackson RA, Rossi N, Crump T, Haynes B, Eisenbarth GS
 "The "BB"-diabetic rat: profound T-cell lymphopenia"
 Diabetes 30, S:887, 1981
62. Johnston C, Pyke DA, Cudworth AG, Wolf E
 "HLA-DR-typing in identical twins with insulin-dependent diabetes: difference between concordant and discordant pairs"
 British Medical Journal 286, S:253, 1983
63. Kemp CB, Knight MJ, Scharp DW, Ballinger WF, Lacy PE
 "Effect of transplantation site on the results of pancreatic islet isografts in diabetic rats"
 Diabetologia 9, S:486, 1973
64. Kemp CB, Knight MJ, Scharp DW, Lacy PE, Ballinger WF
 "Transplantation of isolated pancreatic islets into the portal vein of diabetic rats"
 Nature 244, S:447, 1973

65. Klöppel G
"Inselapparat des Pankreas"
in: "Spezielle Pathologie"
ed: Grundmann E, S:159, Urban und Schwarzenberg-Verlag, 1986
66. Kramp RC, Longndon CC, Smith LH
"Isogenic and allogenic transplantation of duct-ligated pancreas
instreptozotocin diabetic mice"
Europ. Journal of Clin. Investigation 5, S:249, 1975
67. Kretschmer GJ, Sutherland DER, Matas AJ, Cain TL, Najarian JS
"The dispersed pancreas: transplantation without islet purification
in totally pancreatectomized dogs"
Diabetologia 13, S:495, 1977
68. Lacy PE, Davie JM, Finke EH
"Induction of rejection of successful allografts of rat islets by
donor peritoneal exsudative cells"
Transplantation 28, S:415, 1979
69. Lacy PE, Davie JM, Finke EH
"Prolongation of islet allograft survival following in vitro
culture (24°C) and single injection of ALS"
Science 204, S:312, 1979
70. Lacy PE, Davie JM, Finke EH
"Prolongation of islet xenograft survival without continuous immuno-
suppression"
Science 203, S:283, 1980
71. Lacy PE, Davie JM, Finke EH, Scharp DW
"Prolongation of islet allograft survival"
Transplantation 27, S:171, 1979
72. Lacy PE, Finke EH, Jauney CG, Davie JM
"Prolongation of islet xenograft survival by in vitro culture of
rat mega-islets in 95 % O₂"
Transplantation 33, S:588, 1982
73. Lacy PE, Kostianovsky M
"Methode for the isolation of intact islets of Langerhans from the
rat pancreas"
Diabetes 16, S:35, 1967
74. Lacy PE, Lacy EG, Finke EH, Yasunami Y
"An improved methode for the isolation of the islets from the beef
pancreas"
Diabetes 31, S:109, 1982
75. Lagardièr F
"Pankreastransplantation"
in: "Transplantationschirurgie" Bd. III, S:707
ed: Pichlmayr R, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York 1981

76. Lafferty KJ, Prowse SJ
 "Theory and practice of immunoregulation by tissue treatment prior to transplantation"
 World Journal of Surgery 8, S:187, 1984
77. Land W
 Transplantationszentrum München
 Persönliche Mitteilung 1986
78. Landgraf R, Landgraf-Leurs MMC, Burg D, Kampik A, Castro LA, Abendroth D, Illner WD, Land W
 "Long-term follow-up of segmental pancreas transplantation in type I diabetics"
 Transplantation Proceedings (in press) ESOT Congress 1986
79. Lau H, Reemtsma K, Hardy M
 "Pancreatic islet allograft prolongation by donor-specific blood transfusions treated with ultraviolet irradiation"
 Science 217, S:754, 1983
80. Laupacis A, Gardell C, Dupré J, Stiller CR, Keown R, Wallace AC, Thibert P
 "Cyclosporine prevents diabetes in BB/Wistar rats"
 Lancet 1/8, S:10, 1983
81. Leimenstoll G, Zabel P, Schoell R, Müller-Hermelink HK, Niedermayer W
 "Rezidive einer extrakapillären Glomerulonephritis an zwei Nierentransplantaten am gleichen Patienten"
 Deutsche Medizinische Wochenschrift 110, Nr. 37, S:1415, 1985
82. Leiter EH, Beamer WG, Shultz LD
 "The effect of immunosuppression on streptozotocin-induced diabetes mellitus in C 57 BL/KsJ mice"
 Diabetes 32, S:148, 1983
83. Leonard RJ, Lazarow A, Hegre O
 "Pancreatic islet transplantation in the rat"
 Diabetes 22, S:413, 1973
84. Lernmark A, Reedman ZR, Hofmann C, Rubenstein AH, Steiner DF, Jackson RL, Winter R, Troisman HS
 "Islet-cell surface antibodies in juvenile diabetes mellitus"
 New England Journal of Medicine 299, S:375, 1976
85. Leuweneck R
 "Laborwerte der Wistarratte"
 Institut für Anatomie der LMU München
86. Like AA, Anthony M, Guberski DL, Rossini AA
 "Spontaneous diabetes mellitus in the BB/W rat-effects of glucocorticoids, cyclosporine and antiserum to rat lymphocytes"
 Diabetes 32, S:326, 1983

87. Like AA, Appel MC, Rossini AA
"Autoantibodies in the BB/W rat"
Diabetes 31, S:816, 1982
88. Like AA, Butler L, Williams M, Appel MC, Weringer EJ, Rossini AA
"Spontaneous autoimmune diabetes in the BB/W rat"
Diabetes 31 Suppl.1, S:7, 1983
89. Like AA, Kislandskis E, Williams RM, Rossini AA
"Neonatal thymectomy prevents spontaneous diabetes mellitus in the BB/W rat"
Science 216, S:644, 1982
90. Like AA, Rossini AA
"Streptozotocin-induced insulinitis: a model of diabetes mellitus"
Science 193, S:415, 1976
91. Like AA, Rossini AA, Guberski DL, Appel MC, Williams RM
"Spontaneous diabetes mellitus: reversal and prevention in the BB/W rat with antiserum to rat lymphocytes"
Science 206, S:1421, 1979
92. Lindall A, Steffes N, Sorensen R
"Immuno-assayable insulin content of subcellular fraction of the rat islets"
Endocrinology 85, S:218, 1969
93. Lorenz D, Lippert H, Pausig E, Kohler J, Koch G, Tietz W, Hahn JH, Dorn A, Worm V, Ziegler M
"Transplantation of isolated islets of Langerhans in diabetic dogs: III. donor-selection by mixed lymphocyte reaction and immuno - suppressive treatment"
Journal of Surgical Research 27, S:205, 1979
94. Lorenz D, Lippert H, Tietz W, Worm V, Dorn A, Koch G, Ziegler M, Rosenbaum KD
"Transplantation of isolated islets of Langerhans in diabetic dogs"
Journal of Surgical Research 27, S:181, 1979
95. Ludvigsson J, Heding L, Lieden G, Marner B, Lernmark A
"Plasmapheresis in the initial treatment of insulin dependent diabetes mellitus in children"
British Medical Journal 286, S:176, 1983
96. Mandel TE
"Transplantation of organ-cultured fetal pancreas: experimental studies and potential clinical application in diabetes mellitus"
World Journal of Surgery 8, S:158, 1984
97. Mandel TE, Collier S, Carter W
"Effect of in-vitro glucose concentration on fetal mouse pancreas cultures used as grafts in syngenic diabetic mice"
Transplantation 30, S:231, 1980

98. Marliss EB, Nakhooda AF, Poussier P, Sima AAF
"The diabetic syndrome of the BB/Wistar rat: possible relevance to type 1 (insulin-dependent) diabetic mellitus in man"
Diabetologia 22, S:225, 1982
99. Martinelli GP, Chung-Loy R, Sher L, Kacelis D, Miller CM, Schanzer H
"Long-term prolongation of cardiac allografts by subtherapeutic levels of cyclosporine in rats conditioned with pretransplant blood transfusions and cyclosporine"
Transplantation 39, S:1, 1985
100. McEvoy RC, Hegre OD
"Syngeneic transplantations of fetal rat pancreas: III. Effect of insulin treatment on the growth and differentiation of pancreatic implants after reversal of diabetes"
Diabetes 28, S:141, 1979
101. McEvoy RC, Schmitt RV, Hegre OD
"Syngeneic transplantation of the fetal rat pancreas: IV. Dissociated versus whole organ implantation"
Metabolism 18, S:157, 1979
102. Mirkovitch V, Campiche M
"Intrasplenic autotransplantation of canine pancreatic tissue: maintenance of normoglycemia after total pancreatectomy"
Europ. Journal of Surgical Research 9, S:173, 1977
103. Mordes JP, Rossini AA
"Animal models of diabetes"
The American Journal of Medicine 70, S:353, 1981
104. Moskalewski S
"Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig"
Gen.Comp.Endocrinology 5,S:342, 1965
105. Mullen YS, Clark WR, Molnar G, Brown J
Reversal of experimental diabetes by fetal rat pancreas"
Science 195,S:68, 1977
106. Najarian JS, Sutherland DER, Steffes MW
"Isolation of human islets of Langerhans for transplantation"
Transplantation Proceedings 7,S:611,1975
107. Naji A, Silvers WK, Platkin SA, Dafoe D, Barker CF
"Successful islet transplantation in spontaneous diabetes"
Surgery 86, S:218, 1979
108. Naji A, Silvers WK, Barker CF
"Islet transplantation in spontaneously diabetic rats"
Transplantation Proceedings 12,1 S:826, 1981

109. Naji A, Silvers WK, Bellgrau D, Barker CF
 "Spontaneous diabetes in rats: destruction of islets is prevented by immunological tolerance"
 Science 213, S:1390, 1981
110. Nakhooda AF, Like AA, Chappel CI, Murray FT, Marliss EB
 "The spontaneously diabetic Wistar rat - metabolic and morphologic studies"
 Diabetes 26, S:100, 1976
111. Nakhooda AF, Like AA, Chappel CI, Wei CN, Marliss EB
 "The spontaneously diabetic Wistar rat (the "BB"-rat)"
 Diabetologia 14, S:199, 1978
112. Nakhooda AF, Sima AAF, Poussier P, Marliss EB
 "Passive transfer of insulinitis from the "BB"-rat in to the nude mouse"
 Endocrinology 109, S:2264, 1981
113. Nathrath WBJ, Wilson PD, Trejdosiewicz UK
 "Immunohistochemical demonstration of epithelial and urothelial antigens at light- and electronmicroscopic levels"
 Acta Histochemica 25, (Suppl.) S:73, 1982
114. Nussenblatt RB, Rook AH, Wacker WB, Palestine AG, Scher I, Gery I
 "Treatment of intraocular inflammatory disease with Cyclosporine A"
 Lancet 235, S:8344, 1983
115. Paik S, Blue ML, Fleischer N, Shin SI
 "Diabetic susceptibility of BALB/c BOM mice treated with Streptozotocin"
 Diabetes 31, S:808, 1982
116. Perloff LJ, Naji AF, Barker CF
 "Vascularized pancreas versus isolated islet transplantation: an immunological comparison"
 Surgery 88, S:222, 1980
117. Peto R, Pike MC, Armitage P, Breslow NE, Cox DR, Howard SV, Mantel N, McPherson K, Peto J, Smith PG
 "Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient:
 I. Introduction an design"
 British Journal of Cancer 34, S:585, 1976
118. Peto R, Pike MC, Armitage P, Breslow NE, Cox DR, Howard SV, Mantel N, McPherson K, Peto J, Smith PG
 "Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient:
 II Analysis and examples"
 British Journal of Cancer 35, S:1, 1977

119. Pollard DR, Gupta K, Mancino L, Hynie J
 "An immunofluorescence study of the anti-pancreatic islet-cell antibodies in the spontaneously diabetic BB/Wistar rat"
 Diabetologia 25, S:56, 1983
120. Poussier P, Nakhooda AF, Falk JA, Chen Lee, Marliss EB
 "Lymphopenia and abnormal lymphocyte subset in the "BB"-rat: Relationship to the diabetic syndrome"
 Endocrinology 110,5 S:1825, 1982
121. Prowse SJ, Bellgrau D, Lafferty KJ
 "Islet allografts are destroyed by disease occurrence in the spontaneously diabetic "BB"-rat"
 Diabetes 35, S:110, 1986
122. Rabinowitch A, Alejandro R, Noel J, Brunschwig JP, Ryan US
 "Tissue culture reduces Ia antigen-bearing cells in rats and prolongs islet allograft survival"
 Diabetes 31 (Suppl. 4), S:48, 1982
123. Reckard CR, Ziegler MM, Barker CF
 "Physiological and immunological consequences of transplanting isolated pancreatic islets"
 Surgery 74, S:91, 1973
124. Reece-Smith H, Du Toit DF, McShane P, Morris P
 "Effect of Cyclosporine A on rejection of pancreatic islets transplanted under the renal capsule"
 Transplantation 32, S:333, 1981
125. Romeis B
 "Mikroskopische Technik"
 16. Auflage, § 304, R.Oldenburger-Verlag, München, 1968
126. Rossini AA
 "Immunotherapy for insulin-dependent diabetics?"
 New England Journal of Medicine 308, S:333, 1983
127. Rossini AA, Like AA, Chick WL, Appel MC, Cahill GF
 "Studies of Streptozotocin-induced insulinitis and diabetes"
 Proc.Natl.Acad.Sci.,USA/Cell Biology 74, Nr. 6, S:2485, 1977
128. Rossini AA, Mordes JP, Pelletier AM, Like AA
 "Transfusions of whole blood prevent spontaneous diabetes mellitus in the BB/Wistar rat"
 Science 219, S:975, 1983

129. Rynasiewicz JJ, Sutherland DER, Kawahara K, Gorecki P, Najarian JS
"Cyclosporine A prolongation of segmentale pancreatic and islet
allograft function in rats"
Transplantation Proceedings 12, S:270, 1980
130. Scharp DW
"Isolation and transplantation of islet tissue"
World Journal of Surgery 8, S:147, 1984
131. Scharp DW, Downing R, Merrell RC, Greider M
"Isolating the elusive islet"
Diabetes 29 (Suppl.1), S:19, 1980
132. Scharp DW, Downing R, Merrell RC, Numelly S, Kiske D, Greider MH
"New approaches in the methods for isolating mammalian islets of
Langerhans utilizing dog pancreas"
in: "Islet isolation, culture and cryopreservation"
ed: Federlin K, Bretzel RG, Thieme-Stratton-Verlag, New York, 1981
133. Scharp DW, Kemp C, Knight M, Ballinger WF, Lacy PE
"The use of Ficoll in the preparations of viable islets of
Langerhans from rat pancreas"
Transplantation 16, S:686, 1973
134. Scharp DW, Murphy JJ, Newton WT, Ballinger WF, Lacy PE
"Transplantation of islets of Langerhans in diabetic rhesus
monkeys"
Surgery 77, S:100, 1975
135. Schlossmann SF, Hudson L
"Specific purification of lymphocyte population on a digestible
immunoabsorbent"
Journal of Immunology 110, S:313, 1973
136. Schulak JA, Franklin W, Reckard CR
"Morphological and functional changes following intraportal islet
allograft rejection: irreversibility with steroid pulse therapy"
Surgical Forum 28, S:296, 1977
137. Selawry HP, Mui MM, Paul RD, Distasio JA
"Improved allograft survival using highly enriched populations of
rat islets"
Transplantation 37, S: 202, 1984
138. Sibley RK, Sutherland DER, Goetz FC
"Recurrence of type I diabetes mellitus in pancreatic allografts"
Laboratory Investigation 48, S:78 A, 1983
139. Steffes MW, Sutherland DER, Mauer SM, Leonard RJ, Najarian JS,
Brown DM
"Plasma insulin and glucose levels in diabetic rats prior to and
following islet transplantation"
Journal of Laboratory and Clinical Medicine 85, S:75, 1974

140. Sternthal E, Like AA, Sarantis K, Braverman LE
"Lymphocytic thyroiditis and diabetes in the BB/Wistar rat: a new model of autoimmune endocrinopathy"
Diabetes 30, S:1058, 1981
141. Stiller CR, Dupré J, Gent M, Jenner MR, Keown PA, Laupacis A, Martell R, Rodger NW, v.Graffenried B, Wolfe BMJ
"Effects of Cyclosporine immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus"
Science 223, S:1362, 1984
142. Sutherland DER
"Pancreas and islets transplantation/experimental studies"
Diabetologia 20, S:161, 1981
143. Sutherland DER
"Pancreas and islets transplantation/clinical trials"
Diabetologia 20, S:435, 1981
144. Sutherland DER
"Pancreas transplant registry"
World Journal of Surgery 8, S:270, 1984
145. Sutherland DER
"Twin to twin transplantation: reversal and re-enactment of pathogenesis of type I diabetes"
Clinical Research Volume 32,2 S:532, 1984
146. Sutherland DER, Chinn PL, Elick BA, Najarian JS
"Experience with 49 segmental pancreatic transplant in 45 diabetic patients"
Transplantation 34, S:330, 1982
147. Sutherland DER, Chinn PL, Goetz FC, Elick BA, Najarian JS
"Minnesota experience with 85 pancreas transplantations between 1978 and 1983"
World Journal of Surgery 8, S:230, 1984
148. Sutherland DER, Matas AJ, Goetz FC, Najarian JS
"Transplantation of dispersed pancreatic islet tissue in humans"
Diabetes 29 (Suppl.1), S:31, 1980
149. Sutherland DER, Rynasiewicz JJ, Kawahara K, Gorecki P, Najarian JS
"Rejection of islets versus immediately vascularized pancreatic allograft: a quantitative comparison"
Journal of Surgical Research 29, S:240, 1980
150. Sutherland DER, Steffes MW, Mauer SM, Najarian JS
"Isolation of human and porcine islets of Langerhans and islet transplantation in pigs"
Journal of Surgical Research 16, S:102, 1974

151. Theodorou NA, Howell SL
"An assesment of diffusion chambers for use in pancreatic islet transplantation"
Transplantation 27, S:350, 1979
152. Theodorou NA, Vrbova H, Tyhurst M, Howell SL
"Problems in the use of poly-carbonate diffusion chambers for syngenic pancreatic islet transplantation in the rats"
Diabetologia 18, S:313, 1980
153. Traverso LW, Gomez RR
"Investigation of a pancreatic shock factor obtained from the canine pancreas"
Proc. Soc. Exp.Med. Biol. 168, S:245, 1981
154. Tze WJ, Wong FC, Tingle AJ
"The use of high-paque Ficoll in the isolation of pancreatic islets in rats"
Transplantation 22, S:201, 1976
155. Vialettes B, Simon MC, Lassmann V
"Prolonged survival of allotransplanted islets of Langerhans after Cyclosporine A treatment in rats"
Transplantation 25, S:180, 1979
156. Vineyama K, Hashimoto H, Shim K, Satake K
"Ultrastructural studies on the allotransplanted pancreas in dogs"
Diabetes 29 (Supl.1), S:107, 1980
157. Walsh TJ, Eggleston JC, Cameron JL
"Portal hypertension, hepatic infarction and liver failure complicating pancreatic islet auto-transplantation"
Surgery 91, S:485, 1982
158. White DJG, Nagao T, Davies HS
"Experimental transplantation in small animals"
in: "Cyclosporine A" S:89
ed: White DJG, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford 1982.
159. Wysocki LJ, Long JA, Adair W, Scharp DW
"An immunological approach to islet-cell purification"
Journal of Cell Biology 95, S:4061, 1982
160. Yuon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL
"Virus-induced diabetes mellitus: isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis"
New England Journal of Medicine 300, S:1173, 1979

DANKVERMERK

Herrn Prof. Dr. Dr. B.U. von Specht möchte ich danken für die Überlassung des Themas und die große Unterstützung im Verlauf der Doktorarbeit sowie für viel Verständnis, eine hervorragende Arbeitsatmosphäre und eine "Doktorantenpflanze".

Für die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens am Institut für Chirurgische Forschung möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. W. Brendel bedanken und gleichzeitig auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für die kollegiale und fruchtbare Atmosphäre.

Herrn PD Dr. W. Permanetter sei hier für die Anfertigung und Beurteilung aller histologischen Präparate sowie für viel Geduld und hervorragende Zusammenarbeit gedankt.

Für die Insulin- und Glukagonbestimmungen im Endokrinologischen Labor der Chirurgischen Klinik danke ich Herrn PD Dr. R. Teichmann.

Die Bestimmung unendlich vieler Blutzuckerwerte wurden in den Labors des Instituts für Klinische Chemie durchgeführt, wofür Herrn Prof. Vogt besonderer Dank gebührt.

Für die Beratung und Unterstützung bei der statistischen Bewertung der erzielten Ergebnisse danke ich Herrn PD Dr. Köpcke vom ISB in Großhadern.

Die Bestimmung der Cyclosporine-Spiegel im Labor des Transplantationszentrum München danke ich Herrn Prof. Dr. W. Land und Frl. S. Nolting.

Prof. Dr. M. MacAuley aus Halifax möchte ich nochmals für seine Hilfe danken, ohne die es nicht möglich gewesen wäre, BB-Ratten nach München zu bekommen. Für die große Hilfe bei der Betreuung und Haltung der BB-Ratten möchte ich mich bei Frl. U. Schwarz, M. Weindl, H. Kolbeck und K. Staudigl bedanken.

Frl. U. Schwarz und Frl. A. Bohlmann danke ich für die vielen Fotoarbeiten und die immer spontane Hilfsbereitschaft.

Für die große Geduld beim Schreiben und viele gute Einfälle möchte ich mich besonders bei Frau I. Pohl und "ihrem Computer" bedanken.

In den fast 4 Jahren der experimentellen Arbeit teilte ich alle Höhen und Tiefen meiner Arbeit mit meinem Kollegen Alexander Dibelius. Für seinen Humor, die gute Zusammenarbeit und so manches Wochenende bei den Ratten möchte ich mich abschließend ganz besonders herzlich bedanken.

LEBENS LAUF

Harald Königsberger

Geburtsdatum: 13. April 1960
Geburtsort: München
Eltern: Walter Königsberger, Bau-Ingenieur
Christina Königsberger geb. Montag
Fotografin/Hausfrau
Geschwister: Rainer Königsberger, cand.med.

Schulbildung:

Volksschule Krailling September 1966 bis Juli 1970
Kurt-Huber-Gymnasium September 1970 bis Juni 1979
Gräfelfing
Schulaufenthalt in England 1976

Wehrdienst: 01. Juli 1978 bis 04. Oktober 1978

Studium: Wintersemester 1979/80:

Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Ärztliche Vorprüfung August 1981

Ärztliche Prüfung 1. Teil August 1982

Ärztliche Prüfung 2. Teil August 1984

Danach praktisches Jahr mit freiem Fach
Urologie

September 1984 bis Februar 1985:

Praktisches Jahr im Fachbereich Chirurgie
in Südafrika,

- University of the Witwatersrand,
Johannesburg/Dept. of Surgery, Barragwanath
Hospital
- University of Cape Town, Kapstadt/
Dept. of Surgery, Groote Schuur Hospital

Ärztliche Prüfung 3. Teil November 1985

Approbation: 25. November 1985

Mitarbeit am Transplantationszentrum München:

- Organisation von Nieren-, Pankreas- und Herztransplantationen
- Perfusion, Organkonservierung und chirurgische Assistenz im
Rahmen der mobilen Bereitsschaftsgruppe
- Gewinnung von Hornhautmaterial zur Transplantation
- Patientenbetreuung auf der Transplantationsstation
November 1980 bis Dezember 1985.

Restwehrdienst als Stabsarzt:

Sanitätsakademie der Bundeswehr im Institut für Mikrobiologie,
Forschungsbereich monoklonale Antikörper vom 07.01.1986 bis 15.11.86.

Assistent in der Abteilung Allgemeine Chirurgie der Universitätsklinik
Freiburg i. Breisgau seit dem 17.11.86.

